

Biomed Biopharm Res  
20 (1) 1 - S154 (2023)

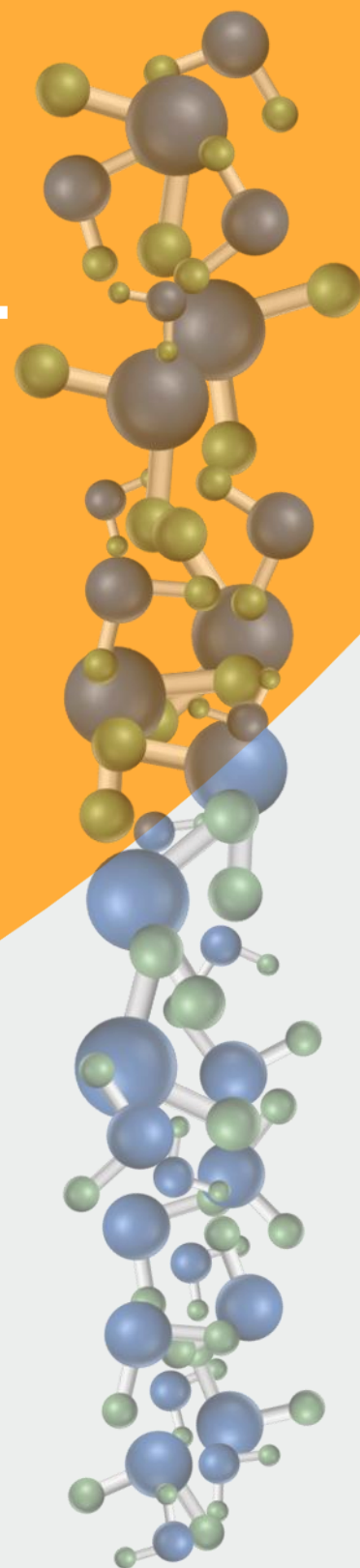
online  
ISSN 2182-2379

Vol. 20, No. 1

# 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

*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

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

#### Property / Propriedade

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

#### Registered Office and Correspondence / Sede Social e Correspondência

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

**Electronic correspondence /  
Correspondência eletrónica**  
[directorales@alies.pt](mailto:directorales@alies.pt)  
[bbr\\_office@alies.pt](mailto:bbr_office@alies.pt)

**Electronic Edition / Edição electrónica**  
<https://www.bbr.alies.pt>

**Distribution / Distribuição**  
ALIES

Dep. Legal: 33195511

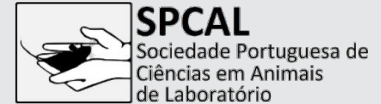
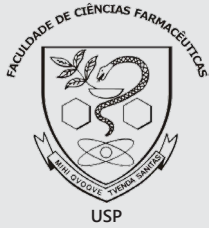
ISSN Print: 2182-2360  
ISSN Online: 2182-2379

**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-in-Chief  

## 2023 - On the same path to a new future

The publication *Biomedical and Biopharmaceutical Research* (BBR), which I have the privilege of directing since its inception (first as *Lusófona Journal of Health Sciences*), has fulfilled its first and main objective with recognized rigor and consistency - that of contributing as an instrument for the progress and dissemination of science conceived and produced in the Portuguese language shared by the Lusophone communities. Made globally accessible by this simultaneous publication in English and Portuguese, this unique feature also created multiple opportunities for publication and scientific "growth" especially for younger researchers around the world.

The editorial progress and organization, although entirely voluntary and therefore not professionalized, has been noticeable and, along with this, the evaluation, review and editing procedures have become more demanding but also more transparent. We can be justifiably proud and pleased of the recognition we have received from publishers such as **CrossRef**, **ELSEVIER-Scopus**, **Google Scholar**, or the recent **ASCI-database**, to name just a few.

We continue on the same path, more determined but also more aware of the challenges we face. As is clear from this long journey, these paths are traced with real objectives in sight and on short horizons. The continuity of the publication depends exclusively on the quality and effort of all of us... every day.

In this issue we illustrate how BBR is entirely assuming this digital challenge. To our options of peer review, exclusively electronic publishing (paperless), at no cost to the author and open access to the reader, we now add submission, review, and decision on a digital platform. It looks quite simple, but it is a huge step for an independent non-profit organization like ours. Only possible thanks to the determination, commitment and enthusiasm of our managers and collaborators.

## 2023 - No mesmo caminho para um novo futuro

A publicação *Investigação Biomédica e Biofarmacêutica* (IBB), que tenho o privilégio de dirigir desde a sua origem (então como *Revista Lusófona de Ciências da Saúde*), tem cumprido com reconhecidos rigor e consistência o seu objectivo primeiro e principal – o de contribuir como instrumento de progresso e divulgação da ciência pensada e concretizada na língua partilhada pelas comunidades lusófonas – o português. Tornado globalmente acessível por este carácter único que a edição simultânea em inglês lhe confere, tem ainda criado múltiplas oportunidades de publicação e de "crescimento" científico, sobretudo para os investigadores mais jovens, em todo o mundo.

O progresso e organização editorial, apesar de inteiramente gratuitas e portanto não profissionalizadas, tem sido notado e, a par deste os procedimentos de avaliação revisão e edição mais exigentes e também mais transparentes. Podemos sentir justificado orgulho e prazer pelos reconhecimentos recebidos de editores como a **CrossRef**, a **ELSEVIER-Scopus**, a **Google Scholar**, ou a recente **ASCI-database**, para citar algumas.

Continuamos neste caminho, mais determinados mas também mais conscientes dos desafios que enfrentamos. Como fica claro deste longo percurso, estes percursos traçam-se com objectivos concretos á vista e em horizontes curtos. A continuidade da publicação depende exclusivamente da qualidade e do esforço de todos nós ... todos os dias.

Neste número ilustramos como a IBB assume por inteiro o desafio digital. Às nossas opções de revisão por pares, edição exclusivamente electrónica (sem papel), sem custos para o autor e de acesso aberto ao leitor, acrescentamos agora a submissão, revisão e decisão em plataforma digital. Parece simples, e a aparência é singela mas, trata-se de um passo gigante para uma organização independente sem fins lucrativos como a nossa. Só possível graças à determinação empenho e entusiasmo dos nossos responsáveis e colaboradores.

We will certainly find many aspects to improve. We count on your understanding and patience but, as said before, this is a step that only precedes the next ones but is absolutely critical for the growth and continuity of this publication.

The present issue also introduces a new editorial line-up, harmonized with the editorial policies of leading publications in these fields, organizing the publications into Original Articles, Short Articles, Review Articles, Study Protocols, and Case Studies, while maintaining a section for Proceedings of Scientific Meetings.

We are grateful to be part of this great story and we can look forward to a brighter future. Only possible with you.

Cheers.

Luís Monteiro Rodrigues  
*Editor-in-Chief*

Certamente encontraremos muitos aspectos a melhorar desde já. Contamos com a vossa compreensão e paciências mas, como disse antes, é um passo que apenas antecede os próximos mas absolutamente critico para o crescimento e para a continuidade da publicação.

O presente número introduz ainda um novo alinhamento editorial, em harmonia com as politicas editoriais de publicações de referencia nestes domínios, organizando as publicações em Artigos Originais, Artigos Breves, Artigos de Revisão, Protocolos de Estudos, e Estudos de Caso, mantendo uma secção de Actas de Reuniões Cientificas

Estamos gratos por fazermos parte desta grande história e podemos esperar mais e melhor futuro. Apenas possível convosco.

Bem hajam.

## Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography

### Comparação das altera es de perfusão após hiperémia reactiva no membro superior avaliadas por Fluxometria de Laser Doppler e por Tomografia Fotoacústica

Sérgio Faloni de Andrade , Tiago Granja , Luís Monteiro Rodrigues  

**Keywords:** OAT, LDF, reactive hyperemia, PORH

**Palavras-chave:** OAT, LDF, hiperémia reactiva, PORH

#### To Cite:

Faloni de Andrade, S., Granja, T., & Monteiro Rodrigues L. (2023) Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography and meta-analysis. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 3-12.

 [10.19277/bbr.20.1.304](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.304)

CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[monteiro.rodrigues@ulusofona.pt](mailto:monteiro.rodrigues@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 10/03/2023  
Accepted / Aceite: 14/04/2023

#### Abstract

Laser Doppler flowmetry (LDF) is one of the most used technologies to access human in vivo blood perfusion. However, its single point measurement capacity in a depth that likely is lower than 1 mm, are major criticisms that limit its utility. New image-based techniques such as Optoacoustic Tomography (OAT) allow the non-invasive observation of larger tissue areas with greater spatial resolution. In this study, we compared synchronized LDF and OAT data during a Post-Occlusion Reactive Hyperemia (PORH) maneuver in the upper limb (occlusion of the brachial artery). Measurements were obtained in the volar forearm (OAT and LDF) and in the fingertip (LDF). All procedures respected the principles of good clinical practices for human research purposes. Results confirm that LDF and OAT signals are significantly correlated at the superficial plexus. LDF does not detect deeper vascular structures of the skin but, even so, it is still very useful to access perfusion in areas with higher capillary density such as the fingertip.

#### Resumo

A fluxometria de laser Doppler (LDF)   uma das tecnologias mais utilizadas para medir a perfusão sanguínea humana in vivo. No entanto, são conhecidas importantes limita es desta técnica pois a medi o está limitada a um ponto único na pele numa reduzida profundidade (provavelmente inferior a 1 mm). Tecnologias mais recentes baseadas em imagem, como a Tomografia Fotoacústica (OAT), permitem a observa o não invasiva de áreas de tecido mais alargadas, com maior resolu o espacial. Neste estudo, comparámos dados de LDF e OAT sincronizados durante uma manobra de Hiperémia Reactiva de Pós-Oclusão (PORH) suprasist lica (artéria braquial) no membro superior. As medi es foram obtidas na parte ventral do antebraço (OAT e LDF) e na ponta do dedo (LDF). Todos os procedimentos respeitaram os princípios de boas práticas clínicas para fins de investiga o em humanos. Os resultados confirmam que os sinais LDF e OAT estão significativamente correlacionados no plexo superficial. O LDF não detecta estruturas vasculares mais profundas da pele mas, mesmo assim, ainda   muito útil para aceder   perfusão em áreas com maior densidade capilar, tais como acontece na ponta do dedo.

## Introduction

The ability of tissues to control their own local blood flow in proportion to their metabolic needs is one of the fundamental principles of circulatory function (1). A clear example of this mechanism is observed in skeletal muscle during exercise, a situation in which blood flow can dramatically exceed resting values (2,3). Adequate hemodynamics depends on an integrated complex process involving multiple sensors and effectors (4) and this includes a permanent adaptation between macrocirculation and microcirculation (5). Disturbance in these basic mechanisms might over-compensate adaptation, leading to disease (6).

Microcirculatory impairment seems to be in the origin of well known conditions such as hypertension, stroke, peripheral artery disease, among others (7, 8). However, these events do not occur independently and, ultimately will affect all components of the cardiovascular system (4). This justifies the continued interest in cardiovascular physiology and in microcirculation specifically, to find better, more descriptive markers with clinical relevance, enabling early diagnostic and better disease prevention (9, 10).

The study of human microcirculation *in vivo* has been at the origin of a wide variety of non-invasive instruments designed to quantitatively describe the individual's vascular status, primarily exploring skin microcirculation (11,12). Some recent reviews have been published on this subject, showing laser Doppler flowmetry (LDF) as one of the most referenced technologies accessing microcirculation function (13,14). However, this optical-based technology provides tissue perfusion only on a single-point acquisition area of the skin at fixed depth, depending on the frequency of the laser light (15,16). Currently, new technologies are able to associate image quantification with biological markers, providing a wider view of the vascular physiology. Among these technologies are confocal microscopy and optical coherence tomography or, more recently, of photoacoustic tomography (OAT) (17-19). However high cost and complex operation limit their applicability.

## Introdução

A capacidade dos tecidos controlarem o seu próprio fluxo sanguíneo local proporcionalmente às suas necessidades metabólicas é um dos princípios fundamentais da função circulatória (1). Um exemplo claro desse mecanismo é observado no músculo esquelético durante o exercício físico, situação em que o fluxo sanguíneo pode exceder, dramaticamente, os valores de repouso (2,3). Uma hemodinâmica adequada depende de um processo integrado, complexo, envolvendo múltiplos sensores e efetores (4). Tal envolve uma adaptação permanente entre a macrocirculação e a microcirculação (5). A alteração desses mecanismos pode comprometer a adaptação, levando à doença (6).

O comprometimento da microcirculação parece estar na origem de condições bem conhecidas como a hipertensão, o acidente vascular cerebral, a doença arterial periférica, entre outras (7,8). No entanto, esses eventos não ocorrem de forma independente e, em última análise, afetarão todos os componentes do sistema cardiovascular (4). Isso justifica o contínuo interesse pela fisiologia cardiovascular e especificamente pela microcirculação, para encontrar marcadores melhores, mais descritivos e com relevância clínica, para permitir o diagnóstico precoce e uma melhor prevenção da doença (9,10).

O estudo da microcirculação humana *in vivo* deu origem a uma grande variedade de instrumentos não invasivos concebidos para descrever quantitativamente o estado vascular do indivíduo, explorando principalmente a microcirculação da pele (11,12). Algumas revisões recentes foram publicadas sobre o assunto, apontando a fluxometria laser Doppler (LDF) como uma das tecnologias mais usadas para aceder a função microcirculatória (13,14). No entanto, esta tecnologia de base óptica, apenas fornece perfusão do tecido numa área de aquisição de ponto único numa profundidade fixa, dependendo da frequência da luz do laser (15,16). Actualmente, as novas tecnologias permitem associar a quantificação de imagens a marcadores biológicos, proporcionando uma visão mais ampla da fisiologia vascular. Entre estas tecnologias contam-se a microscopia confocal e a tomografia de coerência óptica ou, mais recentemente, a tomografia optoacústica (também referida como fotoacústica) (OAT ou PAT) (17-19). No entanto, o alto custo e a complexa operação limitam sua aplicabilidade.

In the present paper we explore the *in vivo* cardiovascular responses obtained after a supra-systolic reactive hyperemia (PORH) applied in the upper arm, registered by LDF and OAT. The goal was to identify the major differences between the two optical-based technologies and, at the same time, to contribute to better understand the mechanisms of microcirculation adaptation involved in this experimental maneuver.

## Materials and Methods

### Recruited Volunteers

This work was developed with three female healthy participants (n=3) with a mean age of  $21.67 \pm 1.15$  years, a mean body mass of  $50.67 \pm 3.79$  kg and a mean body mass index (BMI) of  $19.61 \pm 2.18$  kg/m<sup>2</sup>. Data related to the participants' physiology are presented in Table 1. All procedures followed the principles of the Helsinki Declaration for good clinical practice and were previously approved by the Institutional Ethics Committee (Process CE.ECTS/P10.21). In brief, the selection of participants followed specific inclusion / non-inclusion criteria after informed written consent. Participants were non-smokers and free of any medication or food supplementation.

No presente artigo exploramos as respostas cardiovasculares obtidas *in vivo* após uma hiperemia reactiva supra-sistólica (PORH) aplicada na parte superior do braço, e registada por LDF e OAT. O objetivo foi identificar as principais diferenças entre as duas tecnologias de base óptica e, ao mesmo tempo, contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de adaptação da microcirculação envolvidos nessa manobra experimental.

## Materiais e métodos

### Voluntários Recrutados

O trabalho foi desenvolvido com três participantes saudáveis do sexo feminino (n=3) com idade, massa corporal e índice de massa corporal (IMC) semelhantes. Os dados relativos à fisiologia dos participantes são apresentados na Tabela 1. Todos os procedimentos seguiram os princípios da Declaração de Helsinquia para as boas práticas clínicas e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Processo CE.ECTS/P10.21). Em suma, a seleção dos participantes obedeceu a critérios específicos de inclusão/não inclusão após consentimento informado por escrito. Os participantes eram não fumantes e não tomavam qualquer medicação ou suplementação alimentar.

**Table 1** - Biometric characterization of volunteers. Body Mass Index (BMI), Ankle Brachial Index (ABI), arbitrary units (a.u.), Systolic blood pressure (Syst BP), Diastolic blood pressure (Diast BP), heart rate (HR). Values are expressed as Mean  $\pm$  SD.

**Tabela 1** - Caracterização biométrica dos voluntários. Índice de Massa Corporal (IMC), Índice Tornozelo-Braquial (ITB), Unidades Arbitrárias (u.a.); Pressão Arterial Sistólica (PA Sistólica), Pressão Arterial Diastólica (PA Diast), Ritmo Cardíaco (FC). Valores são expressos como Média  $\pm$  DV.

Age / Idade	$21.67 \pm 1.15$	years / anos
Body mass / Massa corporal	$50.67 \pm 3.79$	kg
Height / Altura	$1.61 \pm 0.06$	m
BMI / IMC	$19.61 \pm 2.18$	kg/m <sup>2</sup>
ABI / ITB	$0.52 \pm 0.08$	(a.u. / u.a.)
Systolic BP / PA Sistólica	$113.33 \pm 11.37$	mmHg
Diastolic BP / PA Diastólica	$84.67 \pm 14.15$	mmHg
Heart Rate / Ritmo Cardíaco	$71.00 \pm 19.05$	bpm



### Experimental

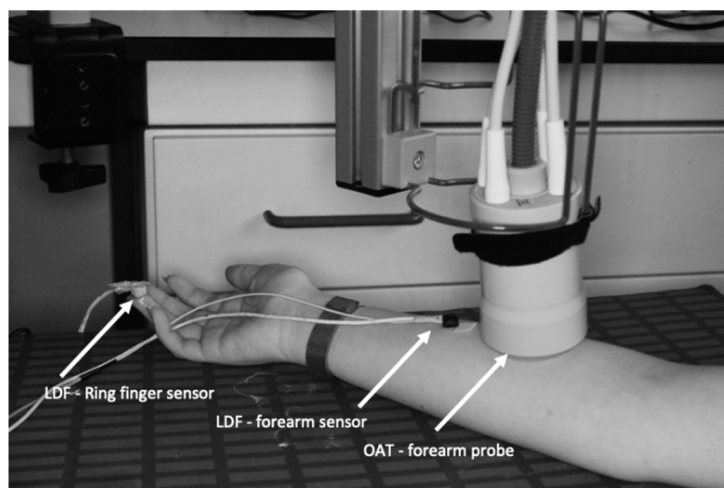
A post-occlusive reactive hyperemia (PORH) was used as a challenger. A pressure cuff was applied to the volunteers' brachial upper arm area prior to the installation of LDF and OAT probes. Participants were brought to resting conditions accessed by heart rate and temperature stabilization to the laboratory environment. The OAT probe was placed at the ventral forearm area, previously described (15). Two LDF probes were equally placed on the same limb - one next to the OAT probe and the other LDF sensor fixed to the ventral aspect of the third finger on the same side (Figure 1). The PORH maneuver was recorded simultaneously in continuous mode in both OAT and LDF technologies over the course of four different stages, resting baseline, cuff inflation to 200 mmHg, occlusion, and recovery. The baseline was recorded for 1 min; the brachial cuff inflation to 200 mmHg was performed over 20 sec; occlusion was held for 1 min at 200 mmHg, and the post-occlusion recovery was recorded for 680 sec.

Perfusion was followed by PeriFlux System 5000 LDF (Perimed AB, Järfälla, Sweden), expressed in arbitrary units of perfusion (PU's), using a red light with 780 nm and by OAT, using an Acuity MSOT (Multispectral

### Experimental

A hiperemia reactiva pós-oclusiva (PORH) foi usada como *challenge*. Para isso, uma manga de pressão foi aplicada na região de um dos braços dos voluntários antes da aplicação das sondas de LDF e OAT. Os participantes foram colocados em condições de repouso até estabilização da frequência cardíaca e da temperatura no ambiente laboratorial. A sonda OAT foi posicionada na região ventral do antebraço, conforme previamente descrito (15). Duas sondas LDF foram colocadas igualmente no mesmo membro - uma próxima à sonda OAT e a outra fixada na face ventral do terceiro dedo do mesmo lado (Figura 1). A manobra PORH foi registrada simultaneamente em modo contínuo nas tecnologias OAT e LDF ao longo de quatro estágios diferentes, linha de base em repouso, insuflação do manguito até 200 mmHg, oclusão e recuperação. A linha de base foi registrada por 1 min; a insuflação do manguito até 200 mmHg foi realizada em 20 segundos; a oclusão foi mantida a 200 mmHg por 1 min e a recuperação pós-oclusão foi registrada por 680 seg.

A perfusão foi registrada por LDF e por OAT. O sinal de LDF (PeriFlux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Suécia), expresso em unidades arbitrárias de perfusão (PU's), utiliza uma luz vermelha com 780 nm. A perfusão por OAT utilizou um sistema de



**Figure 1** - LDF sensors and OAT probe setting prior to the PORH maneuver. Two LDF sensors were placed at the volunteer's ring finger (digit 4) fingertip and in the anterior middle - forearm. The OAT probe was stabilized proximal to the LDF anterior forearm sensor, fixed to a hinged support. The PORH manoeuvre was performed in the same arm where the LDF sensors and OAT probe were placed.

**Figura 1** - Posição dos sensores LDF e da sonda OAT antes da manobra PORH. Um dos sensores LDF foi colocado na ponta do dedo anelar (dígito 4) do voluntário e outra na região anterior do antebraço médio. A sonda OAT foi colocada próxima ao sensor LDF do antebraço, fixada a um suporte articulado. A manobra PORH foi realizada no mesmo braço onde foram colocados os sensores LDF e a sonda OAT.

Optoacoustic Tomography) imaging system (iThera Medical GmbH, Munich, Germany). The OAT system, which produces laser excitation pulses of 9 ns at wavelengths from 680 nm to 980 nm, acquired HbO<sub>2</sub> and Hb chromophore spectra simultaneously for wavelengths ranging from 680 nm to 980 nm, projected as 3D images with a resolution depth of 1.5 cm<sup>3</sup>. Data reconstruction followed the manufacture protocol algorithms (viewMSOT 4.0) after ROI analysis of Hb and HbO<sub>2</sub>, allowing the calculation of total hemoglobin (HbT) and mean O<sub>2</sub> saturation (MSOT SO<sub>2</sub>).

#### *Data analysis*

All graphical layouts were plot on GraphPad Prism 9.2.0 (283) MachineID: 0861F12DB8D10. Correlation analysis using Spearman's two-tailed test were applied to all variables.

### **Results and Discussion**

Exploratory tests such as the supra-systolic post-occlusive reactive hyperemia have been developed to assess local adaptive mechanisms to acute perfusion changes (17). Several proposed markers for microvascular disease (MVD) are related with the reactive perfusion response, however a wide variety of experimental conditions have been impaired proper data translation, limiting their utility (10,12,18). Nevertheless, mechanisms involved in microcirculatory adaptation to occlusion of a major vessel remains largely unknown. Recent results fail to support local reflex mechanisms (19,20) opening further research questions requiring interpretation.

Regarding assessment technologies, LDF provides information on blood perfusion velocity and volume at a relatively superficial depth (21,22). Considering the particular structure of skin microcirculation, we accept that LDF can access only a limited number of vessels and blood (13). Nevertheless, LDF has been extensively used as a gold standard to non-invasively monitor and evaluate local perfusion (23). Modern technologies such as OAT, with higher spatial and temporal resolutions, provide information on hemoglobin oxygenation (24-26). Spectroscopic

imagem Acuity MSOT (Multispectral Optoacoustic Tomography; iThera Medical GmbH, Munique, Alemanha). O sistema OAT, produz pulsos de excitação de laser de 9 ns em comprimentos de onda de 680 nm a 980 nm, que permite adquirir os espectros cromóforos da hemoglobina oxigenada (HbO<sub>2</sub>) e da hemoglobina desoxigenada (Hb) simultaneamente, projetados como imagens 3D com profundidade de resolução de 1,5 cm<sup>3</sup>. A reconstrução dos dados OAT seguiu os protocolos do fabricante (viewMSOT 4.0) após a análise de ROI para Hb e HbO<sub>2</sub> permitindo o cálculo de hemoglobina total (HbT) e da saturação média de O<sub>2</sub> (MSOT SO<sub>2</sub>).

#### *Análise de dados*

Todos os gráficos foram tratados pelo GraphPad Prism 9.2.0 (283) MachineID: 0861F12DB8D10. A análise de correlação usando o teste bicaudal de Spearman foi aplicada a todas as variáveis.

### **Resultados e discussão**

Testes exploratórios como a hiperémia reactiva pós-oclusiva supra-sistólica, foram desenvolvidos para avaliar os mecanismos adaptativos locais às alterações agudas de perfusão (17). Vários marcadores propostos para doença microvascular (MVD) estão relacionados com a resposta reactiva à perfusão, porém uma ampla variedade de condições experimentais tem prejudicado a tradução adequada dos dados, limitando a sua aplicabilidade (10,12,18). Contudo, os mecanismos envolvidos na adaptação microcirculatória à oclusão de um grande vaso permanecem amplamente desconhecidos. Resultados recentes parecem contrariar a ideia de envolverem mecanismos reflexos locais (19,20) abrindo outras direcções de investigação que requerem melhor interpretação.

No que respeita às tecnologias de avaliação, o LDF fornece informações sobre a velocidade e o volume da perfusão sanguínea numa profundidade relativamente superficial (21,22). Considerando a estrutura particular da microcirculação da pele, aceitamos que o LDF possa aceder a um número limitado de vasos (13). No entanto, o LDF tem sido amplamente utilizado como referencia para monitorar e avaliar de forma não invasiva a perfusão local (23). Tecnologias modernas como o OAT, com maior resolução espacial e temporal, fornecem informações sobre a oxigenação da hemoglobina (24-26). Tecnologias espectroscópicas

and tomographic technologies have been applied to study the impact of PORH in skin microvasculature (27-30) but synchronization limitations related to peak recovery time persists (30). We have recently highlighted that microcirculatory HbO<sub>2</sub> adjustment following PORH involves both micro and macrocirculation distributed at different tissue depths (23). Such reaction can only follow a centrally mediated response rather than a local reflex (4).

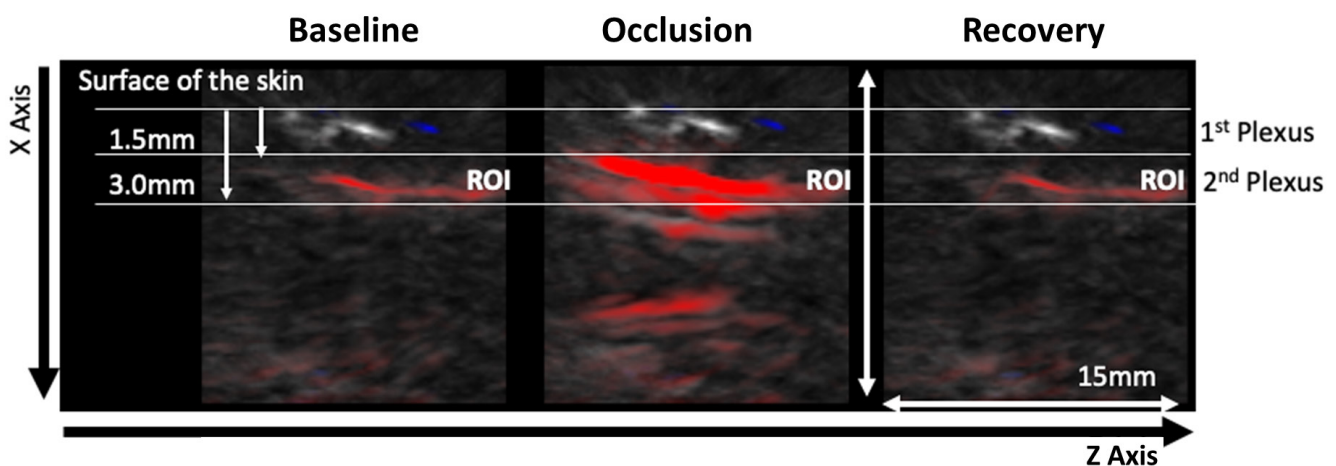
In the present study we explore the analytical performance of LDF and OAT under the same PORH experimental conditions (Figure 1 and Figure 2). Signals collected simultaneously with both systems were synchronized after data collection from all participants (Figure 3 and Figure 4).

The present experimental conditions allowed us to obtain the same perfusion profile with LDF at the volar forearm and at the fingertip with the latter being more prominent (Figure 3A). This effect is possible due to the dense microcirculation network present at the skin of the fingertip, compared with the forearm. This allows higher Doppler effect on single-point measurements, compared at the same

e tomográficas têm sido aplicadas para estudar o impacto da PORH na microvasculatura da pele (27-30), mas persistem limitações de sincronização relacionadas com o tempo de recuperação máximo (30). Recentemente salientámos que o ajuste da HbO<sub>2</sub> microcirculatória após a PORH envolve tanto a micro quanto a macrocirculação distribuída em diferentes profundidades teciduais (23). Essa reação só pode seguir uma resposta mediada centralmente, em vez de um reflexo local (4).

No presente estudo, exploramos o desempenho analítico do LDF e da OAT sujeitas às mesmas condições experimentais PORH (Figura 1 e Figura 2). Os sinais coletados simultaneamente com ambos os sistemas foram sincronizados após a coleta de dados de todos os participantes (Figura 3 e Figura 4).

Nestas condições obtivemos o mesmo perfil de perfusão LDF na parte ventral do antebraço e na ponta do dedo, apesar desta última mais proeminente (Figura 3A). Tal poderá dever-se à densa rede de microcirculatória da ponta do dedo, em comparação com o antebraço, permitindo um maior efeito Doppler em medições de ponto único, em comparação com



**Figure 2** - Representative OAT frames for data acquisition during the PORH protocol. The PORH maneuver involved three phases A) Baseline (60 sec); B) Occlusion at 200 mmHg (60 sec) with a brachial cuff; C) Post occlusive recovery (580 sec). Perfusion was recorded continuously. Videos of the skin microvasculature (axis XZ) show the impact of the challenger at the superficial plexus (1.5 mm deep) and at the deeper skin plexus (3.0 mm deep). The red colour represents the HbO<sub>2</sub> chromophore. /

**Figura 2** - Imagens representativas obtidas através de OAT durante a manobra de PORH. A manobra PORH envolveu três fases: A) Linha de base (60 seg.); B) Oclusão a 200 mmHg (60 seg.) com manguito braquial; C) Recuperação pós-oclusiva (580 seg.). A perfusão foi registada continuamente. Vídeos da microvasculatura da pele (eixo XZ) mostram o impacto da PORH no plexo superficial (1,5 mm de profundidade) e no plexo cutâneo mais profundo (3,0 mm de profundidade). A cor vermelha representa o cromóforo HbO<sub>2</sub>.

skin depth with the volar forearm (31-33). In fact, at the volar forearm skin, vascular structures are wider and the space between plexus longer, while they are much closer to each other at the fingertip (32).

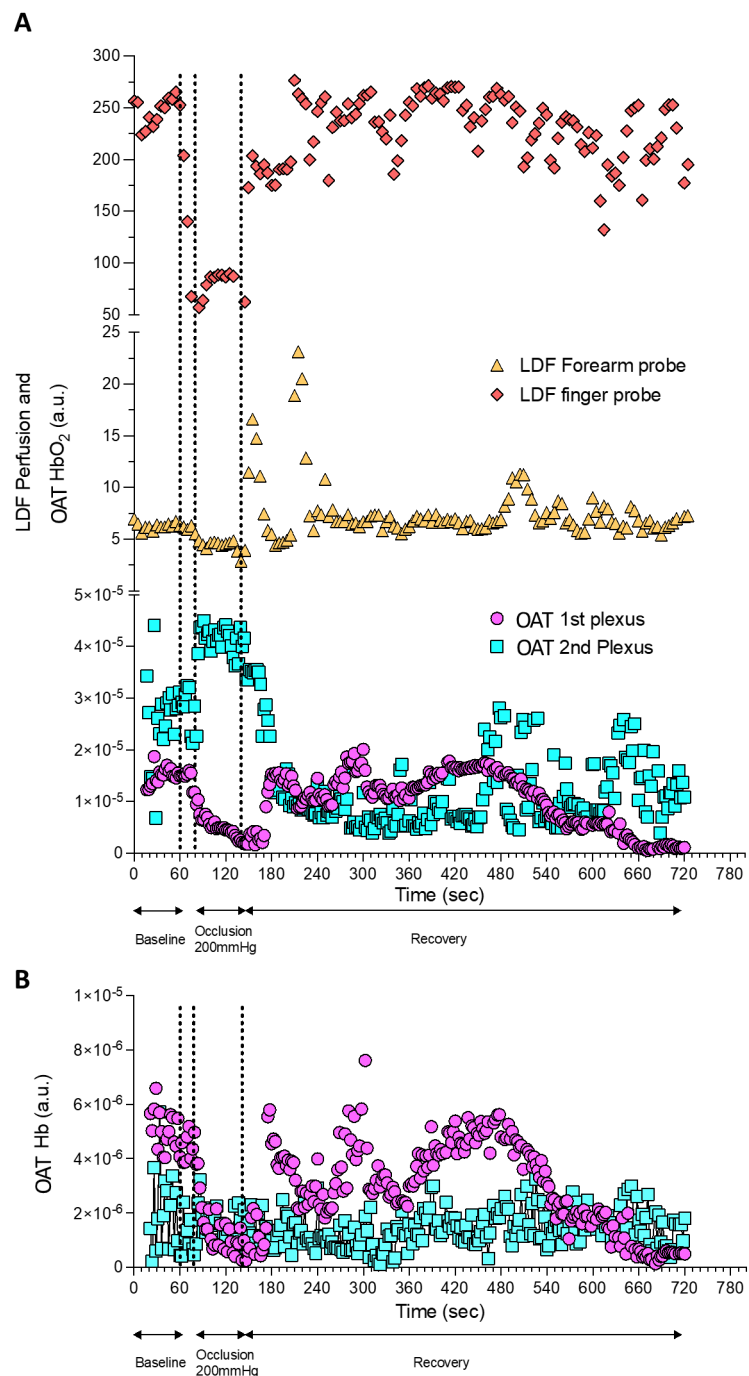
The PORH protocol involved a rapid reduction of tissue perfusion with the cuff occlusion (never reaching "zero"), followed by a rapid increase of perfusion of HbO<sub>2</sub> after the cuff deflation, reaching baseline values

a mesma profundidade da pele na região ventral do antebraço (31-33). De facto, na pele da região ventral do antebraço, as estruturas vasculares são mais largas e o espaço entre os plexos maior, enquanto na ponta dos dedos estão muito mais próximas umas das outras (32).

O protocolo PORH envolveu uma rápida redução da perfusão tecidual com a oclusão provocada pelo manga insuflada (nunca atingindo "zero"), seguida de um rápido aumento da perfusão de HbO<sub>2</sub> após

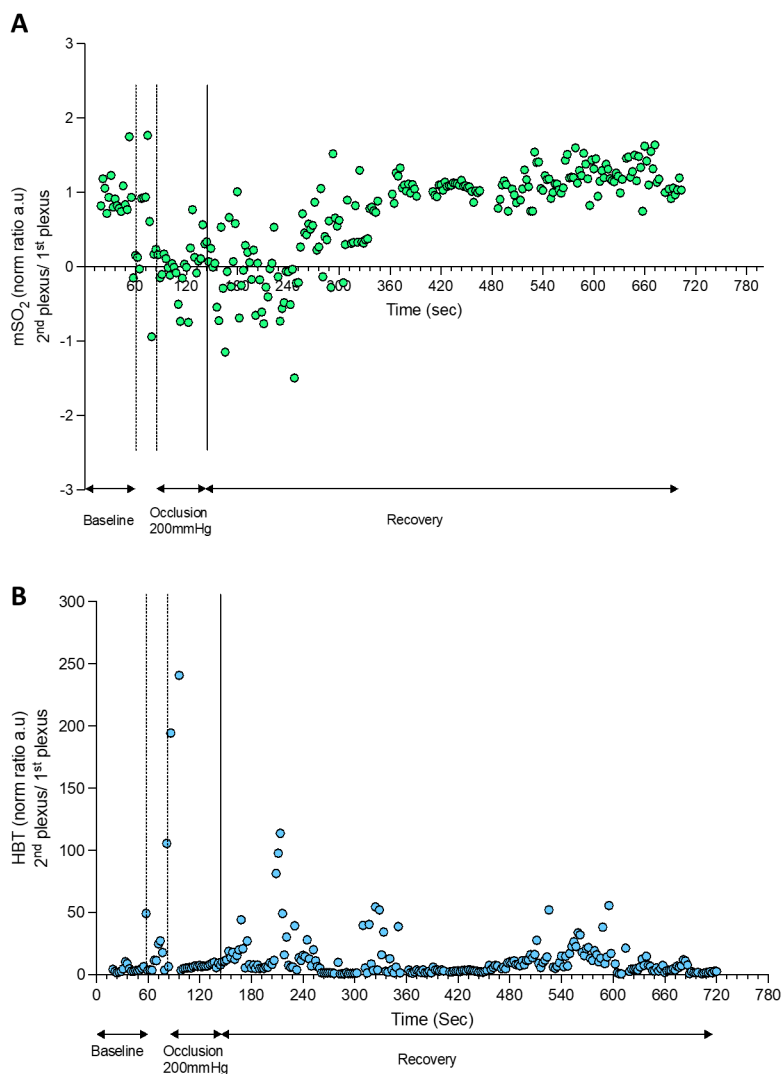
**Figure 3** - Perfusion changes detected by OAT and LDF during a PORH maneuver. OAT and LDF acquired signals were continuously synchronized during the PORH protocol.

**Figura 3** - Alterações de perfusão detectadas por OAT e LDF durante a manobra de PORH. Os sinais OAT e LDF adquiridos foram continuamente sincronizados durante o protocolo PORH.



during recovery. OAT offers much different spatial and temporal resolutions compared to LDF in a volume of 1.5 mm<sup>3</sup> (34). Therefore, through OAT we were able to identify both the superficial and the deeper skin plexus. Additionally, we can show that occlusion progressively provokes a HbO<sub>2</sub> perfusion decrease at the superficial plexus and an increase of HbO<sub>2</sub> at the deeper plexus, explained by blood transfer between plexus recently described (23,25).

a desinsuflação, atingindo valores basais durante a recuperação. O OAT oferece resoluções espaciais e temporais muito diferentes em comparação com o LDF num volume de 1,5 mm<sup>3</sup> (34). Portanto, por meio do OAT conseguimos identificar tanto o plexo cutâneo superficial, quanto o plexo cutâneo mais profundo. Adicionalmente, podemos mostrar que a oclusão provoca progressivamente uma diminuição da perfusão de HbO<sub>2</sub> no plexo superficial e um aumento da HbO<sub>2</sub> no plexo mais profundo, explicada pela transferência sanguínea entre estes plexos descrita recentemente (23,25).



**Figure 4** - HbT and mSO<sub>2</sub> calculated by OAT during a PORH maneuver.

**Figura 4** - HbT e mSO<sub>2</sub> calculados pelo OAT durante uma manobra de PORH.

The cuff deflation allowed recovery of HbO<sub>2</sub>, with restoration to baseline levels after 580 seconds. As perceived, the occlusion is taking place in the arm (brachial artery) and measurements are being obtained at the skin volar forearm and fingertip. Thus these responses are not local but rather mediated by a central / medullar reflex (4).

LDF and OAT technologies differ in terms of spatial resolution, tissue penetration depth, interaction between the light and the tissue and as a consequence, in the nature of the provided variables. Nevertheless, our correlation analysis found significant positive correlations between LDF signals registered in the fingertip and in the volar forearm, and between the fingertip LDF signal and the OAT superficial plexus signal.

In conclusion, this exploratory study confirms that both technologies have utility in measuring local as distal effects of forced circulatory changes, although much greater detail is available using OAT.

### **Funding**

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

### **Contribution of the authors**

All authors equally contributed to the manuscript as it shows in its final form.

### **Conflict of Interests**

The editors involved in this manuscript's 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.

A desinsuflação do manguito permitiu a recuperação da HbO<sub>2</sub>, com retorno aos níveis basais após 580 segundos. Conforme descrito, a oclusão teve lugar no braço (artéria braquial) e as medidas foram obtidas na face volar do antebraço e na ponta do dedo. Estas respostas não são locais, mas sim mediadas por um reflexo central/medular (4).

As tecnologias LDF e OAT diferem em termos de resolução espacial, profundidade de penetração no tecido, interação entre a luz e o tecido e, conseqüentemente, na natureza das variáveis fornecidas. No entanto, nossa análise de correlação encontrou correlações positivas significativas entre os sinais LDF registados na ponta do dedo e na parte ventral do antebraço, e entre o sinal LDF da ponta do dedo e o sinal do plexo superficial no OAT.

Em conclusão, este estudo exploratório confirmou que ambas as tecnologias são úteis na medição dos efeitos locais e distais das alterações circulatórias forçadas, embora muito mais detalhes estejam disponíveis através do OAT.

### **Financiamento**

Esta pesquisa é financiada pela ALIES e COFAC, os principais provedores da tecnologia OAT, e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/04567/2020 para o CBIOS.

### **Contribuição dos autores**

Todos os autores contribuíram igualmente para o manuscrito na sua forma final.

### **Conflito de interesses**

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

## References / Referências

- Hall, J. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th Edition ed.).
- Segal, S. S. (1994). Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension*, 23(6 Pt 2), 1113-1120. doi:10.1161/01.hyp.23.6.1113
- Trinity, J. D., Broxterman, R. M., & Richardson, R. S. (2016). Regulation of exercise blood flow: Role of free radicals. *Free radical biology & medicine*, 98, 90-102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.017
- Rodrigues, L. M., Rocha, C., Ferreira, H. T., & Silva, H. N. (2020). Lower limb massage in humans increases local perfusion and impacts systemic hemodynamics. *Journal of Applied Physiology*, 128(5), 1217-1226. doi:10.1152/jappphysiol.00437.2019
- Climie, R. E., Gallo, A., Picone, D. S., Di Lascio, N., van Sloten, T. T., Guala, A., . . . Bruno, R. M. (2019). Measuring the Interaction Between the Macro- and Micro-Vasculature. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. doi:10.3389/fcvm.2019.00169
- Lemaster, K., Jackson, D., Goldman, D., & Frisbee, J. C. (2017). Insidious incrementalism: The silent failure of the microcirculation with increasing peripheral vascular disease risk. *Microcirculation*, 24(2), e12332. doi:<https://doi.org/10.1111/micc.12332>
- SenthilKumar, G., Gutierrez-Huerta, C. A., Freed, J. K., Beyer, A. M., Fancher, I. S., & LeBlanc, A. J. (2022). New developments in translational microcirculatory research. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 323(6), H1167-H1175. doi:10.1152/ajpheart.00566.2022
- Chade, A. R. (2011). Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(4), R783-790. doi:10.1152/ajpregu.00657.2010
- Clough G., & Cracowski, J.-L. (2012). Spotlight Issue: Microcirculation—From a Clinical Perspective. *Microcirculation*, 19(1), 1-4. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00142.x>
- Glazkov, A. A., Krasulina, K. A., Glazkova, P. A., Kovaleva, Y. A., Bardeeva, J. N., & Kulikov, D. A. (2023). Skin microvascular reactivity in patients with diabetic retinopathy. *Microvascular Research*, 147, 104501. doi:10.1016/j.mvr.2023.104501
- Abullarrage, C. J., Sidawy, A. N., Aidinian, G., Singh, N., Weiswasser, J. M., & Arora, S. (2005). Evaluation of the microcirculation in vascular disease. *Journal of vascular surgery*, 42(3), 574-581. doi:10.1016/j.jvs.2005.05.019
- Viridis, A., & Taddei, S. (2011). How to evaluate microvascular organ damage in hypertension: assessment of endothelial function. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*, 18(4), 163-167. <https://doi.org/10.2165/11593630-000000000-00000>.
- Humeau, A., Steenbergen, W., Nilsson, H., & Strömberg, T. (2007). Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 45(5), 421-435. doi:10.1007/s11517-007-0170-5
- Lal, C., & Leahy, M. J. (2016). An Updated Review of Methods and Advancements in Microvascular Blood Flow Imaging. *Microcirculation*, 23(5), 345-363. doi:<https://doi.org/10.1111/micc.12284>
- Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G., & Steenbergen, W. (2009). Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in medical science*, 24(2), 269-283. doi:10.1007/s10103-007-0524-0
- Fagrell, B., & Nilsson, G. (1995). Advantages and Limitations of One-Point Laser Doppler Perfusion Monitoring in Clinical Practice. *Vascular Medicine Review*, vmr-6(2), 97-101. doi:10.1177/1358863x9500600202
- Roustit, M., & Cracowski, J. L. (2012). Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, 19(1), 47-64. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x
- Yang, J., Zhang, G., Chang, W., Chi, Z., Shang, Q., Wu, M., . . . Jiang, H. (2020). Photoacoustic imaging of hemodynamic changes in forearm skeletal muscle during cuff occlusion. *Biomedical optics express*, 11(8), 4560-4570. <https://doi.org/10.1364/BOE.392221>
- Rosenberry, R., & Nelson, M. D. (2020). Reactive hyperemia: a review of methods, mechanisms, and considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 318(3), R605-R618. doi:10.1152/ajpregu.00339.2019
- Young, G. M., Krastins, D., Chang, D., Lam, J., Quah, J., Stanton, T., . . . Askew, C. D. (2021). The Association Between Contrast-Enhanced Ultrasound and Near-Infrared Spectroscopy-Derived Measures of Calf Muscle Microvascular Responsiveness in Older Adults. *Heart, Lung and Circulation*, 30(11), 1726-1733. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hlc.2021.07.004>
- Bonner, R. F., & Nossal, R. (1990). Principles of Laser-Doppler Flowmetry. In A. P. Shepherd & P. Å. Öberg (Eds.), *Laser-Doppler Blood Flowmetry* (pp. 17-45). Boston, MA: Springer US.
- Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G., & Steenbergen, W. (2009). Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science*, 24(2), 269-283. doi:10.1007/s10103-007-0524-0
- Monteiro Rodrigues, L., Granja, T. F., & de Andrade, S. F. (2022). Optoacoustic Imaging Offers New Insights into In Vivo Human Skin Vascular Physiology. *Life*, 12(10), 1628. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/10/1628>
- Hacker, L., Brunker, J., Smith, E. S. J., Quiros-Gonzalez, I., & Bohndiek, S. E. (2020). Photoacoustics resolves species-specific differences in hemoglobin concentration and oxygenation. *Journal of biomedical optics*, 25(9), 095002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.9.095002>
- Granja, T., Faloni de Andrade, S., & Rodrigues, L. M. (2022). Multispectral Optoacoustic Tomography for Functional Imaging in Vascular Research. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (184), 10.3791/63883. doi:10.3791/63883
- Karlas, A., Fasoula, N.-A., Katsouli, N., Kallmayer, M., Sieber, S., Schmidt, S., . . . Ntziachristos, V. (2023). Skeletal muscle optoacoustics reveals patterns of circulatory function and oxygen metabolism during exercise. *Photoacoustics*, 30, 100468. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pacs.2023.100468>
- Dennis, J. J., Wiggins, C. C., Smith, J. R., Isautier, J. M. J., Johnson, B. D., Joyner, M. J., & Cross, T. J. (2021). Measurement of muscle blood flow and O2 uptake via near-infrared spectroscopy using a novel occlusion protocol. *Scientific Reports*, 11(1), 918. doi:10.1038/s41598-020-79741-w
- McLay, K. M., Nederveen, J. P., Pogliaghi, S., Paterson, D. H., & Murias, J. M. (2016). Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. *Physiological Reports*, 4(9), e12772. doi:<https://doi.org/10.14814/phy2.12772>
- Yang, J., Zhang, G., Chang, W., Chi, Z., Shang, Q., Wu, M., . . . Jiang, H. (2020). Photoacoustic imaging of hemodynamic changes in forearm skeletal muscle during cuff occlusion. *Biomedical Optics Express*, 11(8), 4560-4570. doi:10.1364/BOE.392221
- Didier, K. D., Hammer, S. M., Alexander, A. M., Caldwell, J. T., Sutterfield, S. L., Smith, J. R., . . . Barstow, T. J. (2020). Microvascular blood flow during vascular occlusion tests assessed by diffuse correlation spectroscopy. *Experimental Physiology*, 105(1), 201-210. doi:<https://doi.org/10.1113/EP087866>
- Tibiriçá, E., Matheus, A. S. M., Nunes, B., Sperandei, S., & Gomes, M. B. (2011). Repeatability of the evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser doppler perfusion monitoring: clinical and statistical implications. *Clinics*, 66(4), 599-605. doi:<https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000400013>
- Roustit, M., Blaise, S., Millet, C., & Cracowski, J. L. (2010). Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvascular Research*, 79(2), 102-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.01.001>
- Pouratian, N., & Toga, A. W. (2002). 5 - Optical Imaging Based on Intrinsic Signals. In A. W. Toga & J. C. Mazziotta (Eds.), *Brain Mapping: The Methods (Second Edition)* (pp. 97-140). San Diego: Academic Press.
- Tiago Granja, S. F. d. A., and Luis Monteiro Rodrigues. (2021). Optoacoustic Tomography – good news for microcirculatory research. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 18(2), 200-212. doi: 10.19277/bbr.18.2.269

## Evaluation of the Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) inhibitory activity of pimaranes and their glycosyl derivatives

### Avaliação da atividade inibitória da proteína tipo Lisil oxidase 2 (LOXL2) de pimaranos e seus derivados glicosídicos

Sandra Ferreira<sup>1,4</sup> , Patrícia Rijo<sup>1,2</sup> , João G. Costa<sup>1</sup> , Nuno Saraiva<sup>1</sup> , Beatriz Santos<sup>1</sup>, Clara Uriel<sup>3</sup> , Ana María Gómez<sup>3</sup> , A. M. Díaz-Lanza<sup>4</sup> , & Ana S. Fernandes<sup>1</sup>  

**Keywords:** breast cancer, lysyl oxidase-like 2, inhibitors, pimaranes, *Aeollanthus rydingianus*, MTT

**Palavras-chave:** cancro da mama, proteína tipo lisil oxidase 2, inibidores, pimaranos, *Aeollanthus rydingianus*, MTT

#### To Cite:

Ferreira, S., Rijo P., Costa, J. G., Saraiva N., Santos, B., Uriel, C., Gómez, A. M., Díaz-Lanza, A. M., & Fernandes, A. S. (2023) Evaluation of the Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) inhibitory activity of pimaranes and their glycosyl derivatives. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 13-24.

 [10.19277/bbr.20.1.305](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.305)

1 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

2 - Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

3 - Instituto de Química Orgánica, CSIC, Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid, Spain

4 - Universidad de Alcalá de Henares. Facultad de Farmacia, Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Farmacología); Ctra. Madrid-Barcelona km. 33,600 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Correspondence to / Correspondência a:  
[ana.fernandes@ulusofona.pt](mailto:ana.fernandes@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 20/03/2023  
Accepted / Aceite: 15/05/2023

#### Abstract

Lysyl oxidase (LOX) and LOX-like 1-4 (LOXL 1-4) enzymes catalyze the cross-linking of elastin and collagen in the extracellular matrix, facilitating cell migration and invasion. The inhibition of these enzymes, particularly LOXL2, has been suggested as a therapeutic strategy to prevent breast cancer metastasis. In this work, new natural LOXL2 inhibitors were searched from *Aeollanthus rydingianus*, a medicinal plant rich in bioactive products. Five pimarane diterpenoids, two isolated from the plant and three derivatives, were tested. These compounds have been described for their bioactive properties such as anti-tumor, anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities. In this regard, we intended to explore the mechanisms of these compounds by studying their effects on LOXL2 activity. Two pimarane diterpenoids showed a mild LOXL2 inhibitory activity as evaluated by an Amplex Ultra Red-based technique. The cytotoxicity of the most active compound was analyzed by the MTT assay in the MDA-MB-231 cell line, representative of triple-negative breast cancer. This compound decreased cell viability as single agent and increased the cytotoxic effect of doxorubicin. Its glycoconjugate was considerably more toxic, likely due to a higher uptake by cancer cells.

#### Resumo

A lisil oxidase (LOX) e as proteínas tipo lisil oxidase 1-4 (LOXL 1-4) catalisam a ligação cruzada de elastina e colagénio na matriz extracelular, facilitando a migração e invasão celulares. A inibição destas enzimas, particularmente LOXL2, tem sido sugerida como estratégia terapêutica para prevenir metástases do cancro da mama. Neste trabalho, novos inibidores naturais de LOXL2 foram investigados a partir de *Aeollanthus rydingianus*, uma planta medicinal rica em produtos bioativos. Cinco diterpenóides de pimarano, dois isolados da planta e três derivados foram testados. Estes compostos foram previamente descritos pelas suas propriedades bioativas, tais como antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana. Neste sentido, pretendemos explorar os mecanismos destes compostos, estudando os seus efeitos na atividade da LOXL2. Dois diterpenóides pimaranos mostraram uma ligeira atividade inibitória da LOXL2, avaliada por uma técnica baseada no Amplex Ultra Red. A toxicidade do composto mais ativo foi analisada pelo ensaio MTT na linha celular MDA-MB-231, representativa do cancro da mama triplo negativo. Este composto diminuiu a viabilidade celular como agente isolado e aumentou o efeito citotóxico da doxorubicina. O seu glicoconjugado foi consideravelmente mais tóxico, provavelmente devido a uma maior captação pelas células tumorais.



## Introduction

Lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like 1 to 4 (LOXL1-LOXL4) are copper-dependent amine oxidases that covalently cross-link collagen and elastin in the extracellular matrix (ECM; Figure 1) (1–3). These LOX/LOXL proteins have been implicated in the pathogeny of several diseases, including cancer, as they are expressed in various tissues and organs (4). They serve different roles, such as regulation of gene transcription and control of cell proliferation and motility (5). The expression deregulation of these enzymes has been implicated in fibrotic processes, cancer, and neurodegenerative diseases (6–8). LOXL2 is the most studied of these enzymes and presents extracellular and intracellular activities (Figure 1) (9). Extracellularly, its overexpression promotes collagen cross-linking mediated by the deamination of lysine residues, which increases the rigidity of the ECM. Such changes in the density and rigidity of the ECM promote the invasion and progression of tumor cells through integrin modulation (9). At the intracellular level, LOXL2 can promote the activation of processes that deregulate the epithelial-to-mesenchymal transition. Some of these mechanisms are influenced by hydrogen peroxide, which is formed during the catalytic process of this enzyme and is related to the invasive effects of LOXL2 (10).

LOXL2 has been studied in breast cancer and particularly in triple-negative breast cancer (TNBC). This type of tumor represents 15% to 20% of breast cancer cases and is strongly related to metastatic disease (11,12). Previous studies have shown that the expression of LOX (13) and LOXL2 (14) is increased in TNBC tumors. The expression of LOX and LOXL1-4 has also been studied in the representative TNBC human cell line MDA-MB-23, suggesting that the LOX and LOXL2 enzymes have the strongest association with an invasive/metastatic phenotype (15). A bioinformatics analysis made by our group showed that LOXL2 expression is associated with lower disease-free survival in breast cancer patients, particularly in the triple-negative and luminal A subtypes (16). Moreover, in TNBC, LOXL2 expression correlates with increased cancer-associated fibroblasts and endothelial cells and with decreased lymphocyte infiltrates, which are also characteristics of a poorer prognosis (16). These

## Introdução

Lisil oxidase (LOX) e proteínas tipo lisil oxidase 1 a 4 (LOXL1-LOXL4) são aminas oxidase dependentes do cobre que covalentemente se ligam ao colagénio e elastina na matriz extracelular (MEC; Figura 1) (1–3). Estas proteínas LOX/LOXL têm sido implicadas na patogenicidade de várias doenças, incluindo o cancro, uma vez que são expressas em vários tecidos e órgãos (4). Desempenham papéis diferentes, tais como a regulação da transcrição genética e o controlo da proliferação e motilidade celulares (5). A desregulação da expressão destas enzimas tem sido implicada em processos fibróticos, cancro e doenças neurodegenerativas (6–8). LOXL2 é a mais estudada destas enzimas e apresenta atividades extracelulares e intracelulares (Figura 1) (9). Extracelularmente, a sua sobreexpressão promove a reticulação do colagénio mediada pela desaminação dos resíduos de lisina, o que aumenta a rigidez da MEC. Tais alterações na densidade e rigidez da MEC promovem a invasão e progressão das células tumorais, através da modulação da integrina (9). A nível intracelular, a LOXL2 promove a ativação de processos que desregulam a transição epitelial-mesenquimatosa. Alguns destes mecanismos são influenciados pelo peróxido de hidrogénio, que é formado durante o processo catalítico desta enzima e está relacionado com os efeitos invasivos da LOXL2 (10).

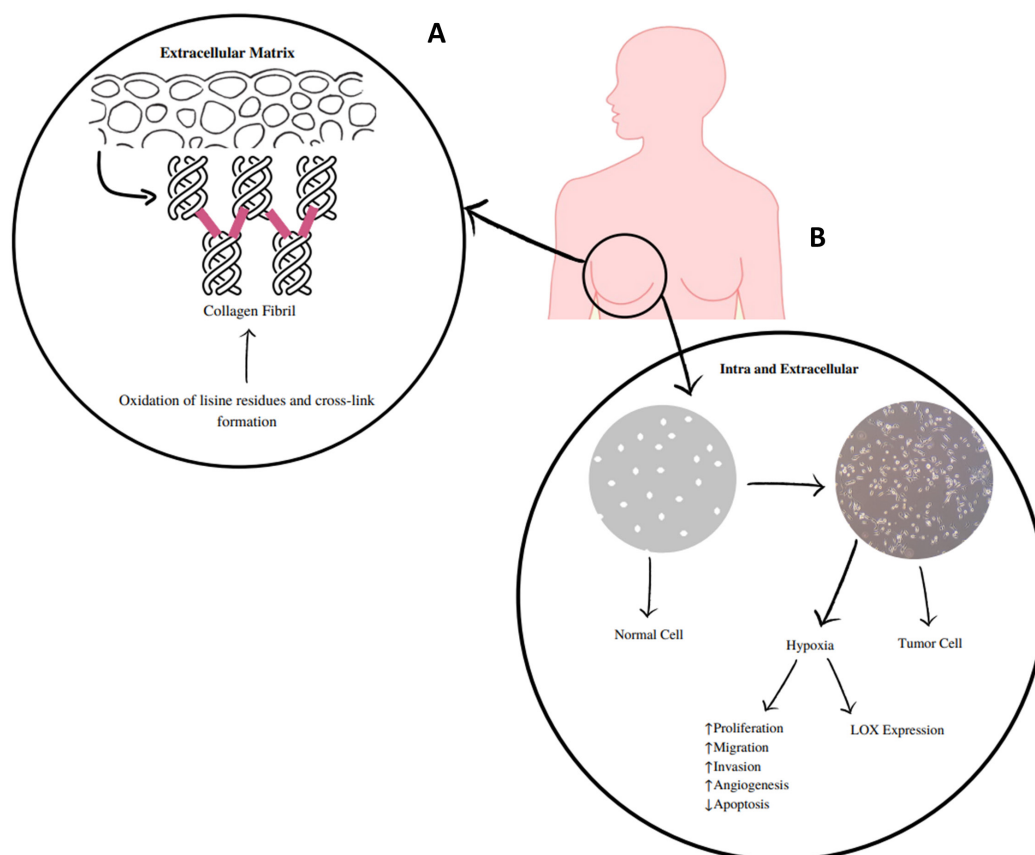
LOXL2 tem sido estudada no cancro da mama e particularmente no cancro da mama triplo negativo (CMTN). Este tipo de tumor representa 15% a 20% dos casos de cancro da mama e está fortemente relacionado com a doença metastática (11,12). Estudos anteriores mostraram que a expressão de LOX (13) e LOXL2 (14) está aumentada nos tumores de CMTN. A expressão de LOX e LOXL1-4 também foi estudada na linha celular humana representativa de CMTN, MDA-MB-23, sugerindo que as enzimas LOX e LOXL2 têm a associação mais forte com um fenótipo invasivo/metastático (15). Uma análise bioinformática feita pelo nosso grupo mostrou que a expressão da LOXL2 está associada a uma menor sobrevida livre de doença em doentes com cancro da mama, particularmente nos subtipos triplo negativo e luminal A (16). Além disso, no CMTN, a expressão de LOXL2 correlaciona-se com o aumento de fibroblastos e células endoteliais associadas ao cancro e com a diminuição dos infiltrados linfocitários, que são também características de um pior prognóstico (16).

aspects, along with the scarce therapeutic options currently available, make TNBC a suitable candidate to benefit from LOXL2 inhibition.

Since antiquity, plants have been used as sources of compounds with therapeutic activity. In fact, the first LOX inhibitor known was  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN) is a phytochemical compound present in sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.) (17,18). The current knowledge and available technology can greatly

Estes aspetos, juntamente com as escassas opções terapêuticas atualmente disponíveis, tornam o CMTN um candidato adequado para beneficiar da inibição da LOXL2.

As plantas têm sido utilizadas desde a antiguidade como fontes de compostos com atividade terapêutica. De facto, o primeiro inibidor da LOX conhecido foi o  $\beta$ -aminopropionitrilo (BAPN), um composto fitoquímico presente nas ervilhas-doce



**Figure 1 - A)** LOXs catalyze the cross-linking of elastin and collagen in the extracellular matrix, which is mediated by the deamination of lysine residues and increases the stiffness of the extracellular matrix.

**B)** Extracellular and intracellular mechanisms of LOX and LOXL 1-4. These enzymes, in particular LOXL2, are implicated in extracellular and intracellular activities. At the extracellular level, they cause changes in the density and rigidity of the extracellular matrix that promote the invasion and progression of tumor cells. Intracellularly, tumor hypoxia promotes LOXL2 upregulation, which will contribute to the deregulation of the epithelial-to-mesenchymal transition and to the pro-invasive effects of LOXL2. Some of these mechanisms are influenced by the release of hydrogen peroxide.

**Figura 1 - A)** LOXs catalisam a ligação cruzada da elastina e colagénio na matriz extracelular, a qual é mediada pela desaminação dos resíduos de lisina e aumenta a rigidez da matriz extracelular.

**B)** Mecanismos extracelulares e intracelulares das LOX e LOXL 1-4. Estas enzimas, em particular LOXL2, estão implicadas em atividades extracelulares e intracelulares. A nível extracelular, elas causam alterações na densidade e rigidez da matriz extracelular que promovem a invasão e progressão das células tumorais. Intracelularmente, a hipóxia tumoral promove a sobreexpressão da LOXL2, o que irá contribuir para a desregulação da transição epitelial-mesenquimatosa e para os efeitos pró-invasivos da LOXL2. Alguns destes mecanismos são influenciados pela libertação de peróxido de hidrogénio.

contribute to the discovery of new drugs obtained from traditional plants.

In this work, pimarane-type compounds isolated from *Aeollanthus rydingianus* (Lamiaceae) or their derivatives were screened as potential inhibitors of the human LOXL2 (hLOXL2). The genus *Aeollanthus* Mart. ex Spreng. (Labiatae) comprises over 100 species and occurs mainly in southern Africa and Brazil. Plants of this genus contain compounds with interesting biological activities, including antimicrobial, antifungal and anticonvulsant properties (19). The species studied herein, *Aeollanthus rydingianus* Van Jaarsv. and A.E. van Wyk, grows in northern Namibia and southern Angola in soils that are relatively moist and acidic (20). From the aerial parts of this plant, different pimarane compounds have been isolated (19). These compounds have been described for their therapeutic properties, including antitumor, anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities (19,21). Glycosidic derivatives were included as it has been reported/shown that linking a glycoside moiety to a given drug can improve its efficacy and selectivity for cancer cells. Due to their higher metabolic rate, the uptake of glycosylated drugs, likely mediated by glucose transport proteins, is much higher in cancer cells than in normal ones. In this context, the glycosylation of bioactive natural compounds may provide tumor-targeting properties, minimizing potentially deleterious systemic effects (22).

## Material and methods

### Chemicals

Five pimarane compounds (Figure 2), 7, 15-isopimaradien-19-ol [1], O- $\beta$ -D-mano-copyranoside-7,15-isopimaradiene [2], 19-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene [3], lagascatriol [4] and lagascatriol-16-O- $\alpha$ -D-mannopyranoside [5] (19,21) were obtained as previously described (21). Human LOXL2 was acquired from Sino Biological (Beijing, China). Amplex Ultra Red (AUR), sodium borate and BAPN were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Urea was obtained from VWR International (Darmstadt, Germany). Sodium chloride was acquired from José M. Vaz Pereira, S.A (Benavente, Portugal). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased

(*Lathyrus odoratus* L.) (17,18). Os conhecimentos e tecnologia atualmente disponíveis podem contribuir grandemente para a descoberta de novos fármacos obtidos a partir de plantas tradicionais.

Neste trabalho, foram investigados como potenciais inibidores da LOXL2 humana (hLOXL2) compostos do tipo pimarano, isolados a partir de *Aeollanthus rydingianus* (Lamiaceae) ou derivados destes. O género *Aeollanthus* Mart. ex Spreng. (Labiatae) inclui mais de 100 espécies e ocorre principalmente na África Austral e no Brasil. As plantas deste género contêm compostos com atividades biológicas interessantes, incluindo propriedades antimicrobianas, antifúngicas e anticonvulsivantes (19). A espécie aqui estudada, *Aeollanthus rydingianus* Van Jaarsv. e A.E. van Wyk, cresce no norte da Namíbia e no sul de Angola, em solos relativamente húmidos e ácidos (20). A partir das partes aéreas desta planta, foram isolados diferentes compostos pimaranos (19). Estes compostos bioativos foram descritos pelas suas propriedades terapêuticas como antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana (19,21). Os derivados glicosídicos foram incluídos, uma vez que foi descrito que a ligação de uma fração glicosídica a um determinado fármaco melhora a sua eficácia e seletividade para as células cancerígenas. Devido à sua taxa metabólica mais elevada, a absorção de fármacos glicosilados, provavelmente mediada por proteínas transportadoras de glicose, é muito mais elevada nas células cancerígenas do que nas normais. Neste contexto, a glicosilação de compostos naturais bioativos proporcionará propriedades de alvos tumorais, minimizando efeitos sistémicos potencialmente deletérios (22).

## Material e métodos

### Produtos químicos

Os compostos de pimarano (Figura 2), 7,15-isopimaradieno-19-ol [1], O- $\beta$ -D-manoco-piranoside-7,15-isopimaradiene [2], 19-O- $\beta$ -D-glucopiranoside-7,15-isopimaradiene [3], lagascatriol [4] e lagascatriol-16-O- $\alpha$ -D-manopiranosideo [5] (19,21) foram obtidos como descrito anteriormente (21). A LOXL2 humana foi adquirida à Sino Biological (Pequim, China). Amplex Ultra Red (AUR), borato de sódio e BAPN foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). A ureia foi obtida da VWR International (Darmstadt, Alemanha). O clorito de sódio foi adquirido a José M. Vaz Pereira, S.A (Benavente, Portugal). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos à Biowest (Nuaille, França). Foram obtidos da

from Biowest (Nuaillé, France). Horseradish peroxidase (HRP), penicillin-streptomycin solution, trypsin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, and doxorubicin were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Matrigel™ was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

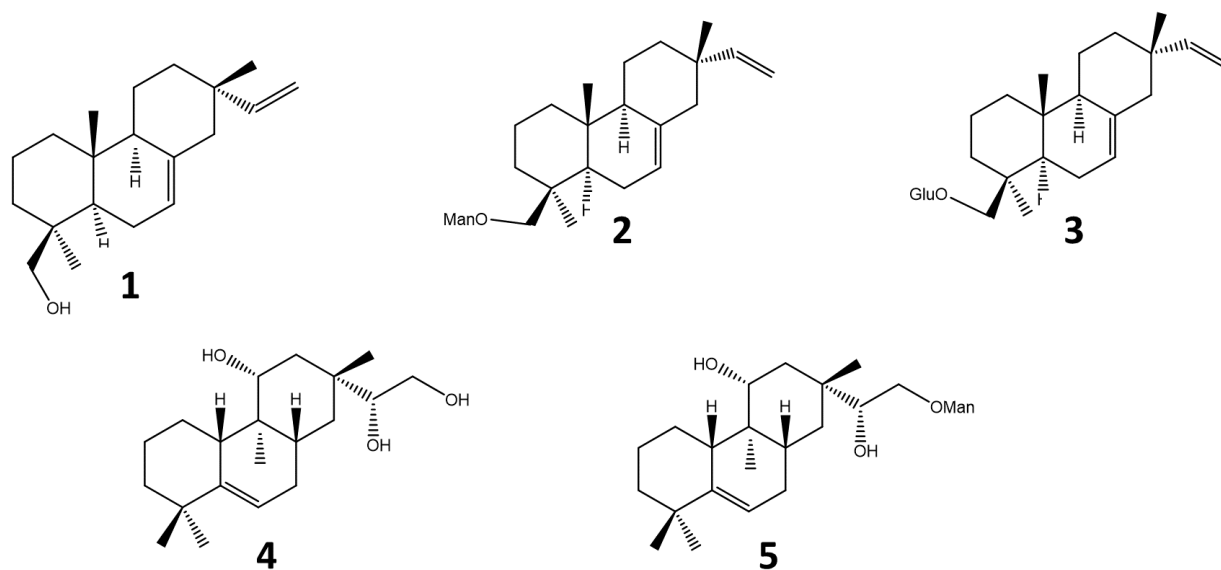
### Biochemical assay

The activity of human hLOXL2 was determined by measuring the hydrogen peroxide released during the reaction using the AUR reagent in the presence of HRP (23,24). Compounds and hLOXL2 (10 nM) were added to Assay Buffer (0.05 M sodium borate, 1.2 M urea, and 0.01 M sodium chloride at pH 8.0) in black-wall 96-well optical plates. After 15 minutes of incubation at 37°C, cadaverine (0.5 mM), AUR (50 μM) and HRP (0.5 U mL<sup>-1</sup>) were added. The fluorescence was measured on a BioTek Synergy HTX, using an excitation wavelength of 563 nm and emission of 587 nm over 50-minute kinetics. The rate of the reaction was obtained from the slope of the linear portion of the read. The method was validated using BAPN as positive control (24).

Merck (Darmstadt, Alemanha) peroxidase de rábano (HRP), solução de penicilina-estreptomicina, tripsina, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, e doxorubicina. Matrigel™ foi comprado à BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

### Ensaio bioquímico

A atividade da hLOXL2 humana foi determinada pela medição do peróxido de hidrogénio libertado durante a reação, utilizando o reagente AUR na presença do HRP (23,24). Os compostos e a hLOXL2 (10 nM) foram adicionados ao tampão de ensaio (0,05 M de borato de sódio, 1,2 M de ureia, e 0,01 M de cloreto de sódio a pH 8,0), em placas óticas de 96 poços de fundo preto. Após 15 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados cadaverina (0,5 mM), AUR (50 μM) e HRP (0,5 U mL<sup>-1</sup>). A fluorescência foi medida numa BioTek Synergy HTX, usando um comprimento de onda de excitação de 563 nm e emissão de 587 nm, numa cinética ao longo de 50 minutos. A velocidade da reação foi obtida a partir do declive da região linear da curva. O método foi validado usando BAPN como controlo positivo (24).



**Figure 2** - Pimaranes diterpenes isolated from *Aeollanthus rydingianus* (**1** and **4**) and their derivatives (**2**, **3** and **5**). [1] 7, 15-isopimaradien-19-ol, [2] 19-O- $\alpha$ -D-mannopyranoside-7,15-isopimaradiene, [3] 19-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene; [4] lagascatriol; [5] lagascatriol-16-O- $\alpha$ -D-mannopyranoside.

**Figura 2** - Diterpenos pimaranos isolados a partir de *Aeollanthus rydingianus* (**1** e **4**) e seus derivados (**2**, **3** e **5**). [1] 7, 15-isopimaradien-19-ol, [2] 19-O- $\alpha$ -D-mannopyranoside-7,15-isopimaradiene, [3] 19-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene; [4] lagasca-triol; [5] lagasca-triol-16-O- $\alpha$ -D-mannopyranoside.

### Cell culture

The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from ATCC. Cells were kept in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin. Cultures were incubated at 37 °C, under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

### Cell viability assay

The effect of the pimaranes on cell viability, either individually or in combination with doxorubicin, was determined by the MTT assay. Briefly,  $6 \times 10^3$  cells, were cultured in 200  $\mu$ L of a complete medium in 96-well plates. The cells were grown for 24 h and then exposed to different concentrations of the pimaranes and/or doxorubicin (1 and 5  $\mu$ M), for a 24 h or 48 h period. The MTT reduction assay was performed as previously described (25). Three to seven independent experiments were performed, and five replicate cultures were used for each condition. The IC<sub>50</sub> values were calculated using GraphPad software (version 8), using the logarithm of the concentrations versus the percentage of cell viability.

### Statistical Analysis

Differences in mean values of the results were evaluated by Student's t-test, after assessing the normality and the homogeneity of the variances of continuous variables. The analyses were performed with SPSS statistical package (version 25, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

### Cultura de células

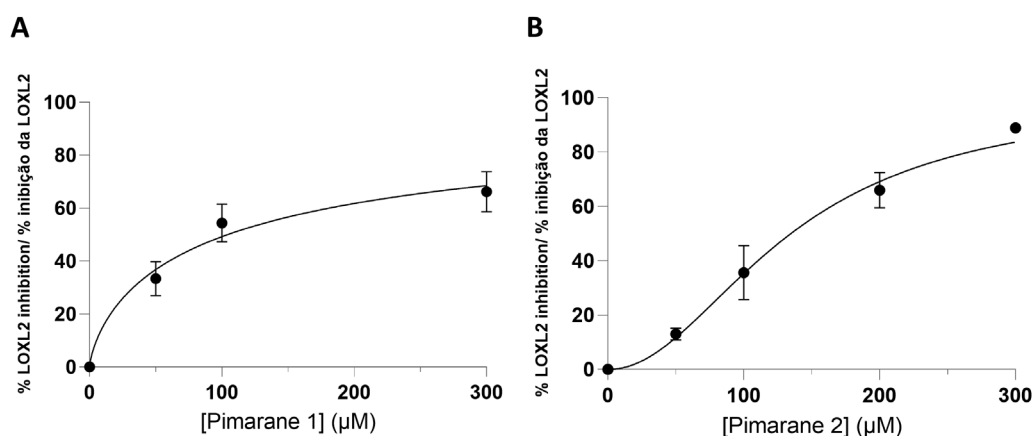
A linha de células humanas de cancro da mama MDA-MB-231 foi obtida da ATCC. As células foram mantidas em DMEM suplementadas com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

### Ensaio de viabilidade celular

O efeito dos pimaranos na viabilidade celular, quer aplicados isoladamente quer em combinação com a doxorubicina, foi determinado pelo ensaio do MTT. Em resumo,  $6 \times 10^3$  células, foram cultivadas em 200  $\mu$ L de meio completo em placas de 96 poços. As células foram mantidas durante 24 h e depois expostas a diferentes concentrações de pimaranos e/ou doxorubicina (1 e 5  $\mu$ M), durante um período de 24 h ou 48 h. O ensaio de redução do MTT foi realizado como descrito anteriormente (25). Foram realizadas três a sete experiências independentes e foram realizados cinco replicados para cada condição. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados no software GraphPad (versão 8), utilizando o logaritmo das concentrações versus a percentagem de viabilidade celular.

### Análise Estatística

As diferenças nos valores médios dos resultados foram avaliadas pelo teste de t-Student, depois de avaliar a normalidade e a homogeneidade das variâncias das variáveis contínuas. As análises foram realizadas com o software estatístico SPSS (versão 25, SPSS Inc. Chicago, IL, EUA).



**Figure 3** - LOXL2 inhibition assay, according to the Amplex Ultra Red technique. **A)** Pimarane 1. **B)** Pimarane 2.  
**Figure 3** - Ensaio de inibição da LOXL2, de acordo com a técnica *Amplex Ultra Red*. **A)** Pimarano 1. **B)** Pimarano 2.

**Table 1** -  $IC_{50}$  values for the inhibition of hLOXL2, obtained by the Amplex Ultra Red technique. BAPN -  $\beta$ -aminopropionitrile; ND - Not determined.

**Tabela 1** - Valores de  $IC_{50}$  para a inibição da hLOXL2, obtidos pela técnica *Amplex Ultra Red*. BAPN -  $\beta$ -aminopropionitrilo; ND - Não Determinado.

Compound / Composto	$IC_{50}$
BAPN	228.1 nM
1	104.4 $\mu$ M
2	134.8 $\mu$ M
3	ND
4	ND
5	ND

## Results

The five compounds studied in this work were screened for their ability to inhibit hLOXL2, using the Amplex Ultra Red methodology. The obtained results are shown in Table 1. The assay was first validated with BAPN, as it has been previously described as a LOXL2 inhibitor. An  $IC_{50}$  value of 228.1 nM was obtained for BAPN, which is in accordance with the values reported in the literature (24).

All pimaranes were initially tested at a concentration of 100  $\mu$ M. The naturally occurring pimarane **1** and its mannose derivative **2** were able to inhibit hLOXL2. The non-glycosylated form had a higher activity. The respective concentration-response curves are shown in Figure 3. Both compounds exhibited  $IC_{50}$  values in the micromolar range: 104  $\mu$ M for compound **1** and 134  $\mu$ M for compound **2** (Table 1). Contrarily to compound **1** and its mannose derivative (**2**), the glucose conjugate of compound **1** (pimarane **3**) did not show hLOXL2 inhibitory activity at the 100  $\mu$ M concentration. The same lack of activity was observed for the natural pimarane **4** and its mannose derivative **5**.

Pimaranes **1** and **2**, which showed LOXL2 inhibitory activity, were further studied to characterize their impact on cell viability. The cytotoxicity study was carried out in the MDA-MB-231 cell line, using the MTT assay, after treatment periods of 24 and 48 hours as described in the previous section. The concentrations of pimarane compounds **1** and **2** were chosen to allow for the definition of the cytotoxicity profile, i.e., from non-toxic to highly toxic concentrations. However, in the case of 24 hour incubation with compound **1**, the limited solubility of the compound precluded studies with higher concentrations.

## Resultados

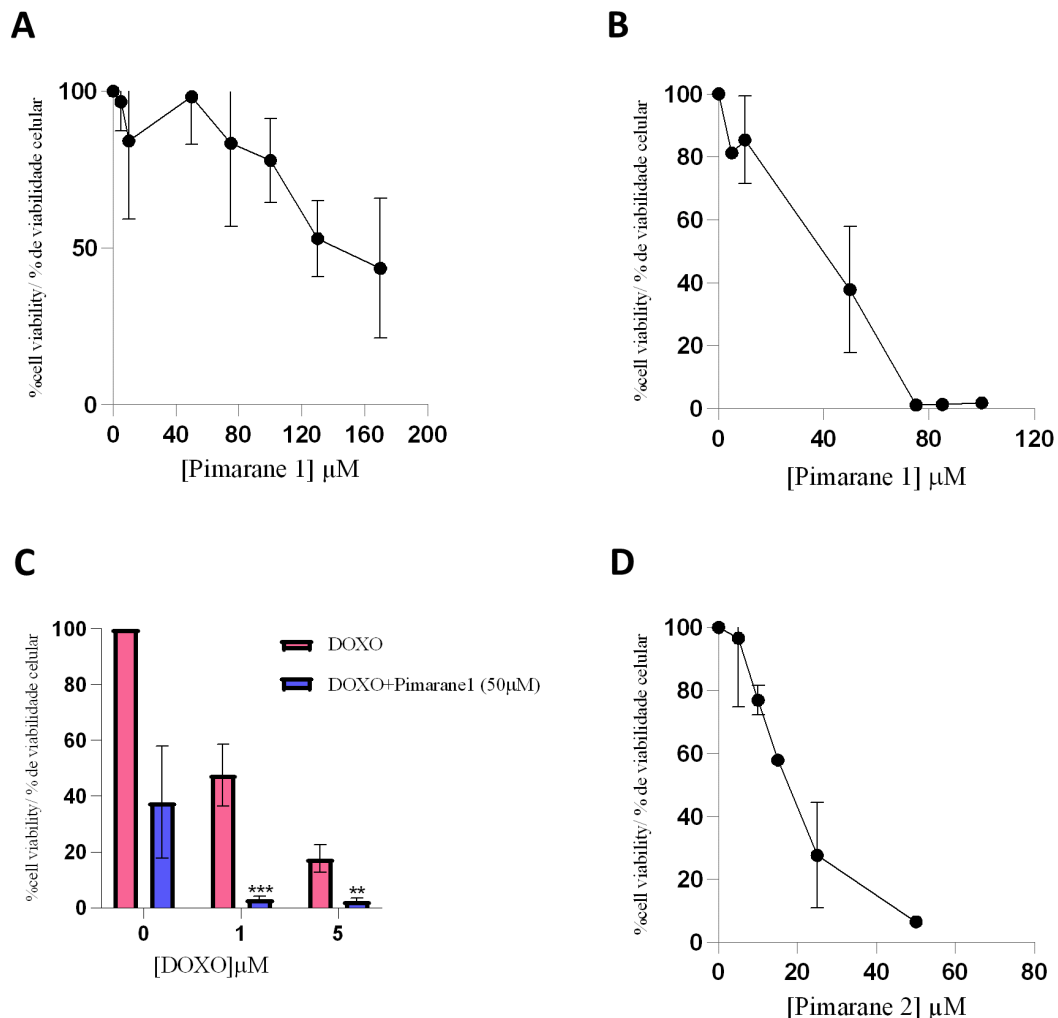
Os cinco compostos estudados neste trabalho foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a hLOXL2, utilizando a metodologia *Amplex Ultra Red*. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. O ensaio foi primeiro validado com BAPN, como controlo positivo. Para este composto, foi obtido um valor  $IC_{50}$  de 228,1 nM, o que está de acordo com os valores reportados na literatura (24).

Todos os pimaranos foram inicialmente testados a uma concentração de 100  $\mu$ M. O pimarano **1**, de ocorrência natural, e o seu derivado de manose **2** foram capazes de inibir a hLOXL2. A forma não glicosilada demonstrou ser a mais ativa. As respetivas curvas de concentração-resposta são mostradas na Figura 3. Ambos os compostos exibiram valores de  $IC_{50}$  na gama micromolar: 104  $\mu$ M para o composto **1** e 134  $\mu$ M para o composto **2** (Tabela 1). Contrariamente ao composto **1** e ao seu derivado de manose **2**, o conjugado de glucose do composto **1** (pimarano **3**) não mostrou atividade inibidora de hLOXL2 na concentração de 100  $\mu$ M. A mesma falta de atividade foi observada para o pimarano natural **4** e para o seu derivado de manose **5**.

Os pimaranos **1** e **2**, que mostraram atividade inibitória da LOXL2, foram ainda estudados para caracterizar o seu impacto na viabilidade celular. O estudo da citotoxicidade foi realizado na linha celular MDA-MB-231, utilizando o ensaio MTT, após períodos de tratamento de 24 e 48 horas, como descrito na secção anterior. As concentrações dos compostos **1** e **2** foram escolhidas de modo a permitir a definição do perfil de citotoxicidade, ou seja, desde concentrações não tóxicas até concentrações altamente tóxicas. No entanto, no caso da incubação de 24 horas com o composto **1**, a solubilidade limitada do composto impediu a realização de estudos com concentrações mais elevadas.

Pimarane **1** exerted cytotoxic effects that were concentration- and time-dependent, as depicted in Figures 4A and 4B. The  $IC_{50}$  values obtained for this compound were 113.4  $\mu$ M (24 h) and 49.5  $\mu$ M (48 h). Since the inhibition of LOXL2 has been suggested as a strategy to sensitize TNBC cells to conventional therapy (26), the cytotoxicity of pimarane **1** (50  $\mu$ M) in combination with doxorubicin (1 and 5  $\mu$ M) was also evaluated (Figure 4C). As expected, doxorubicin alone decreased the cell viability in a concentration-dependent manner. Moreover, when pimarane **1** was given in combination with doxorubicin,

O pimarano **1** exerceu efeitos citotóxicos que eram dependentes da concentração e do tempo, como descrito nas Figuras 4A e 4B. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para este composto foram 113,4  $\mu$ M (24 h-incubação) e 49,5  $\mu$ M (48 h-tratamento). Uma vez que a inibição da LOXL2 foi sugerida como estratégia para sensibilizar as células CMTN à terapêutica convencional (26), foi também realizado o estudo de citotoxicidade do pimarano **1** (50  $\mu$ M) em combinação com a doxorubicina (1 e 5  $\mu$ M). Os resultados são mostrados na Figura 4C. Como esperado, a doxorubicina isoladamente diminuiu a viabilidade celular de uma forma concentração-dependente. Além disso, quando o pimarano **1** foi administrado em



**Figure 4** - Impact of pimaranes **1** and **2** in the viability of MDA-MD-231 cells, evaluated by the MTT assay. **A)** Pimarane **1**, 24 hours incubation. **B)** Pimarane **1**, 48 hours incubation. **C)** Co-incubation of pimarane **1** (50  $\mu$ M) and doxorubicin, 48 hours incubation; \*\*\*  $p < 0.001$  and \*\*  $p < 0.01$  when compared with doxorubicin-exposed cells. **D)** Pimarane **2**, 24 hours incubation.

**Figura 4** - Impacto dos pimaranos **1** e **2** na viabilidade das células MDA-MD-231, avaliado pelo ensaio do MTT. **A)** Pimarano **1**, 24 horas de incubação. **B)** Pimarano **1**, 48 horas de incubação. **C)** Co-incubação de pimarano **1** (50  $\mu$ M) e doxorubicina, 48 horas de incubação; \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*  $p < 0.01$  quando comparado com as células expostas à doxorubicina **D)** Pimarano **2**, 24 horas de incubação.

the cytotoxicity was much more pronounced as a consequence of a possible additive effect. The difference in the viability of the cells that received the combined treatment when compared to the viability of the cells only exposed to doxorubicin was statistically significant for both concentrations of doxorubicin ( $p < 0.01$ ). Pimarane **2** also decreased the viability of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner (Figure 4 D), with an  $IC_{50}$  value of  $16.6 \mu\text{M}$  for 24 hour treatment. Comparing both pimaranes, it is clear that pimarane **2** is considerably more toxic than pimarane **1**.

## Discussion and conclusions

LOXL2 inhibitors have been suggested as a promising treatment to prevent metastasis and invasion of breast cancer (3). Among the different breast cancer subtypes, TNBC seems particularly relevant in this context.

A screening of some pimarane diterpenoid compounds with the abietane skeleton, obtained from a *Lameacea* plant, was conducted. From the five compounds analyzed, only pimaranes **1** and **2** demonstrated inhibition of LOXL2 activity. However, although these two compounds inhibited LOXL2, they presented higher  $IC_{50}$  values when compared to the positive control BAPN or to synthetic LOXL2 inhibitors previously reported in the literature (27–29). The concentrations of pimarane compounds **1** and **2** required for an efficient LOXL2 inhibition may be difficult to achieve in an eventual clinical context.

For the cytotoxicity assay, the cell line MDA-MB-231 was chosen. These cells are commonly used as an *in vitro* model of TNBC since they are highly aggressive, invasive, and poorly differentiated, and lack oestrogen and progesterone receptors expression, as well as HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) amplification. Furthermore, these cells express high levels of LOXL2, and their invasiveness is mediated by proteolytic degradation of the extracellular matrix. For the combinatory assay, the anticancer drug doxorubicin was used, as it is widely used in chemotherapy regimens for metastatic breast cancer (25). Both pimaranes **1** and **2** exhibited considerable

combinação com a doxorubicina, a citotoxicidade foi muito mais pronunciada como consequência de um possível efeito aditivo. A diferença na viabilidade celular das células que receberam o tratamento combinado quando comparada com a viabilidade celular das células apenas expostas à doxorubicina foi estatisticamente significativa para ambas as concentrações de doxorubicina ( $p < 0,01$ ). O pimarano **2** também diminuiu a viabilidade das células MDA-MB-231 de uma forma dependente da concentração (Figura 4 D). Este composto mostrou um valor de  $IC_{50}$  de  $16,6 \mu\text{M}$  para o tratamento de 24 horas. Comparando ambos os pimaranos, é evidente que o pimarane **2** é consideravelmente mais tóxico do que o pimarano **1**.

## Discussão e conclusões

Os inibidores da LOXL2 foram sugeridos como um tratamento promissor para prevenir a metastização e a invasão do cancro da mama (3). Entre os diferentes subtipos de cancro da mama, o CMTN parece ser particularmente relevante neste contexto.

Foi realizado um *screening* de alguns compostos diterpenóides de pimarano com o esqueleto de abietano, obtidos a partir de uma planta de *Lameacea*. Dos cinco compostos analisados, apenas os pimaranos **1** e **2** demonstraram inibir a atividade da LOXL2. No entanto, embora estes dois compostos tenham inibido a LOXL2, apresentaram valores de  $IC_{50}$  mais elevados quando comparados com o controlo positivo BAPN ou com os inibidores sintéticos da LOXL2 anteriormente relatados na literatura (27–29). As concentrações dos compostos pimaranos **1** e **2** necessárias para uma inibição eficiente da LOXL2 podem ser difíceis de alcançar num eventual contexto clínico.

Para o ensaio da citotoxicidade, foi escolhida a linha celular MDA-MB-231. Estas células são normalmente utilizadas como modelo *in vitro* de CMTN, uma vez que são altamente agressivas, invasivas e pouco diferenciadas, e carecem de expressão dos recetores de estrogénio e progesterona, bem como de amplificação de HER2 (recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2). Além disso, estas células expressam níveis elevados de LOXL2, e a sua invasividade é mediada pela degradação proteolítica da matriz extracelular. Para o ensaio combinatório, foi utilizado o fármaco antineoplásico doxorubicina, uma vez que é amplamente utilizado em regimes de quimioterapia para o cancro da mama metastático (25). Ambos os pimaranos **1** e **2** exibiram



cytotoxicity in MDA-MB-231 cells at concentrations below those at which LOXL2 activity is inhibited. These data suggest that although the compounds could be further explored as potential anticancer drugs, their interest as LOXL2 inhibitors is limited. In addition, mechanisms unrelated to the inhibition of LOXL2 are likely involved in the cytotoxic effects observed. Likewise, the enhancement of cytotoxicity observed when cells were simultaneously exposed to pimarane **1** and doxorubicin is probably not related to LOXL2 inhibition but ascribed to other mechanisms.

When comparing the cytotoxicity of pimarane compounds **1** and **2**, it is noticeable that pimarane **2** is ~7-fold more toxic than pimarane **1**. The structural difference between these compounds relies on the mannose group. The presence of the sugar may increase the uptake of glycoconjugates by cancer cells, leading to more pronounced cytotoxic effects. Due to the Warburg effect, cancerous tissues consume larger amounts of glucose compared to normal tissue. The glucose transporter GLUT-1 is widely overexpressed in a large percentage of human cancers, including breast cancer (30). Therefore, conjugation of anticancer agents to sugars takes advantage of GLUT-mediated cellular entry for preferential delivery to cancer cells, improving efficacy and selectivity (30). This fact may justify the differential cytotoxicity observed for pimaranes **1** and **2**.

The strategy presented here could be applied to screen other natural compounds as potential LOXL2 inhibitors. Although the compounds studied in this work are not promising as novel inhibitors of LOXL2, pimaranes **1** and **2** could be useful as a starting point for structural optimization towards the design of more potent inhibitors, with potential therapeutic interest. Furthermore, our results corroborate the idea that linking a sugar moiety to a given anticancer drug could constitute a targeting strategy to increase the efficacy of anticancer drugs against breast cancer.

uma considerável citotoxicidade nas células MDA-MB-231 em concentrações abaixo das que inibiram a atividade da LOXL2. Estes dados sugerem que embora os compostos pudessem ser mais explorados como potenciais fármacos anticancerígenos, o seu interesse como inibidores da LOXL2 é limitado. Além disso, os mecanismos não relacionados com a inibição da LOXL2 estão provavelmente envolvidos nos efeitos citotóxicos observados. Do mesmo modo, o aumento da citotoxicidade observado quando as células foram simultaneamente expostas ao pimarano **1** e à doxorubicina provavelmente não está relacionado com a inibição da LOXL2, mas é atribuído a outros mecanismos.

Quando se compara a citotoxicidade dos compostos pimaranos **1** e **2**, nota-se que o pimarano **2** é ~7 vezes mais tóxico do que o pimarano **1**. A diferença estrutural entre estes compostos depende do grupo da manose. A presença do açúcar pode aumentar a absorção de glicoconjugados pelas células cancerígenas, levando a efeitos citotóxicos mais pronunciados. Sabe-se que, devido ao efeito Warburg, os tecidos cancerosos consomem maiores quantidades de glicose em comparação com os tecidos normais. O GLUT-1, o transportador de glicose, é amplamente sobreexpresso numa grande percentagem de cânceros humanos, incluindo o cancro da mama (30). Portanto, a conjugação de agentes anticancerígenos com açúcares permite tirar partido da entrada celular mediada por GLUT para um fornecimento preferencial às células cancerosas, melhorando a eficácia e a seletividade (30). Este facto pode justificar a citotoxicidade diferencial observada para os pimaranos **1** e **2**.

A estratégia do presente trabalho poderia ser aplicada ao estudo de outros compostos naturais como potenciais inibidores da LOXL2. Embora os compostos estudados neste trabalho não sejam promissores como novos inibidores da LOXL2, os pimaranos **1** e **2** poderiam ser úteis como ponto de partida para a otimização estrutural no sentido da conceção de inibidores mais potentes, com potencial interesse terapêutico. Além disso, os nossos resultados corroboram a ideia de que a ligação de uma fração de açúcar a um determinado fármaco anticancerígeno poderia constituir uma estratégia orientada para aumentar a eficácia dos medicamentos anticancerígenos contra o cancro da mama.

## **Author Contributions**

Conceptualization, A.S.F. and P.R.; investigation and data analysis, S.F, J.G.C., N.S., C.U., A.M.G., D.L.A.M., A.S.F. and P.R.; writing—original draft preparation, S.F; writing—review and editing, A.S.F., J.G.C. and PR; supervision, A.S.F.; project administration, A.S.F.; funding acquisition, A.S.F. and P.R.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## **Funding**

This work is funded by national funds through FCT-Foundation for Science and Technology, I.P., under the UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 projects. Research developed with funding from Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programmes FIPID 2019/2020 and Fazer+ ILIND/F+/EI/01/2020).

## **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest. The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## **Contribuições dos Autores**

Conceptualização, A.S.F. e P.R.; investigação e análise de dados, S.F, J.G.C., N.S., C.U., A.M.G., D.L.A.M., A.S.F. e P.R.; escrita—preparação do esboço original, S.F; escrita—revisão e edição, A.S.F., J.G.C. e PR; supervisão, A.S.F.; administração do projeto, A.S.F.; aquisição de financiamento, A.S.F. e P.R.; Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

## **Financiamento**

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT- Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., ao abrigo dos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020. Investigação desenvolvida com financiamento da Universidade Lusófona/ILIND (Programas de Bolsas FIPID 2019/2020 e Fazer+ ILIND/F+/EI/01/2020).

## **Conflitos de interesse**





Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão. Os financiadores não tiveram qualquer papel na conceção do estudo; na recolha, análise, ou interpretação dos dados; na redação do manuscrito, ou na decisão de publicar os resultados.

## References / Referências

- Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare, J. Y., & Keen, C. L. (1998). Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5 Suppl), 996S–1002S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.996S>
- Molnar J., Fong K.S.K., He Q.P., Hayashi K., Kim Y., Fong S.F.T. et al. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1647(1–2), 220–4. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00053-0)
- Ferreira S., Saraiva N., Rijo P., and Fernandes A.S. (2021). LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants*, 10(2), 312. <https://doi.org/10.3390/antiox10020312>
- Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., Boyd, C. D., Csiszar, K., & Hayashi, M. (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *Journal of molecular histology*, 35(8–9), 845–855. <https://doi.org/10.1007/s10735-004-2340-1>
- Barker, H. E., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(8), 540–552. <https://doi.org/10.1038/nrc3319>
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., Garcia, C. A., Velayo, A. C., Jorgensen, B., Biermann, D., Tsai, D., Green, J., Zaffryar-Eilot, S., Holzer, A., Ogg, S., Thai, D., ... Smith, V. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature medicine*, 16(9), 1009–1017. <https://doi.org/10.1038/nm.2208>
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., & Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1), 24–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>
- Kumari S., Panda T.K., and Pradhan T. (2017). Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 32(2), 134–41. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0576-7>
- Setargew Y.F.I., Wyllie K., Grant R.D., Chitty J.L., and Cox T.R. (2021). Targeting lysyl oxidase family mediated matrix cross-linking as an anti-stromal therapy in solid tumours. *Cancers*, 13(3), 491. <https://doi.org/10.3390/cancers13030491>
- Wang W., Wang X., Yao F., and Huang C. (2022). Lysyl Oxidase Family Proteins: Prospective Therapeutic Targets in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12270. <https://doi.org/10.3390/ijms232012270>
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ breast cancer*, 8(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>
- Luo C., Wang P., He S., Zhu J., Shi Y., and Wang J. (2022). Progress and Prospect of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 919072. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.919072>
- Leo, C., Cotic, C., Pomp, V., Fink, D., & Varga, Z. (2018). Overexpression of Lox in triple-negative breast cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 34, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.03.009>
- Ahn, S. G., Dong, S. M., Oshima, A., Kim, W. H., Lee, H. M., Lee, S. A., Kwon, S. H., Lee, J. H., Lee, J. M., Jeong, J., Lee, H. D., & Green, J. E. (2013). LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 141(1), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2662-3>
- Molani Gol R., and Kheirouri S. (2021). The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: A Systematic Review. *Nutrition and Cancer*, 74(2), 405–22. [10.1080/01635581.2021.1897631](https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1897631)
- Ramos, S., Ferreira, S., Fernandes, A. S., & Saraiva, N. (2022). Lysyl Oxidases Expression and Breast Cancer Progression: A Bioinformatic Analysis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 883998. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.883998>
- Sherif H. M. (2010). In search of a new therapeutic target for the treatment of genetically triggered thoracic aortic aneurysms and cardiovascular conditions: insights from human and animal lathyrism. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 11(3), 271–276. <https://doi.org/10.1510/icvts.2010.239681>
- Schilling E.D., Strong F.M. (1955). Isolation, Structure and Synthesis of a Lathyrus Factor from *L. Odoratus*. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 2843–2845.
- Rijo P., Simões M.F., Duarte A., and Rodríguez B. (2009). Isopimarane diterpenoids from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 70(9), 1161–5. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.06.008>
- van Jaarsveld A.E.J., and van Wyk A.E. (2005). Notes on african plants The *Aeollanthus abyssinicus* group (Labiatae). *Bothalia* 35(2), 157-160. <https://doi.org/10.4102/abc.v35i2.391>
- Isca V.M.S., Andrade J., Fernandes A.S., Paixão P., Uriel C., Gómez A.M. et al. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules*, 25(18), 4250. <https://doi.org/10.3390/molecules25184250>
- Sorg B.L., Hull W.E., Kliem H.C., Mier W., and Wiessler M. (2005). Synthesis and NMR characterization of hydroxyurea and mesylglycol glycoconjugates as drug candidates for targeted cancer chemotherapy. *Carbohydrate Research* 340(2), 181–9. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2004.11.024>
- Guerreiro, Í., Vidovic, B., Costa, J. G., Martins, M., Ferreira, S., Oliveira, N. G., Saraiva, N., & Fernandes, A. S. (2023). The Dietary Isothiocyanate Erucin Reduces Kidney Cell Motility by Disturbing Tubulin Polymerization. *Molecular nutrition & food research*, 67(3), e2200581. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200581>
- Hutchinson, J. H., Rowbottom, M. W., Lonergan, D., Darlington, J., Prodanovich, P., King, C. D., Evans, J. F., & Bain, G. (2017). Small Molecule Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Inhibitors: The Identification of an Inhibitor Selective for LOXL2 over LOX. *ACS medicinal chemistry letters*, 8(4), 423–427. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00014>
- Flório, A., Saraiva, N., Cerqueira, S., Almeida, N., Parsons, M., Batinic-Haberle, I., Miranda, J. P., Costa, J. G., Carrara, G., Castro, M., Oliveira, N. G., & Fernandes, A. S. (2019). The manganese(III) porphyrin MnTnHex-2-PyP5+ modulates intracellular ROS and breast cancer cell migration: Impact on doxorubicin-treated cells. *Redox biology*, 20, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.10.016>
- Cebrià-Costa J.P., Pascual-Reguant L., Gonzalez-Perez A., Serra-Bardenys G., Querol J., Cosín M. et al. (2020). LOXL2-mediated H3K4 oxidation reduces chromatin accessibility in triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*, 39(1), 79–121. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0969-1>
- Smithen, D. A., Leung, L. M. H., Challinor, M., Lawrence, R., Tang, H., Niculescu-Duvaz, D., Pearce, S. P., Mcleary, R., Lopes, F., Aljarah, M., Brown, M., Johnson, L., Thomson, G., Marais, R., & Springer, C. (2020). 2-Aminomethylene-5-sulfonylthiazole Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX) and LOXL2 Show Significant Efficacy in Delaying Tumor Growth. *Journal of medicinal chemistry*, 63(5), 2308–2324. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01112>
- Leung L., Niculescu-Duvaz D., Smithen D., Lopes F., Callens C., McLeary R. et al. (2019). Anti-metastatic Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX): Design and Structure-Activity Relationships. *Journal of medicinal chemistry*, 62(12), 5863–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00335>
- Rowbottom M.W., Bain G., Calderon I., Lasof T., Lonergan D., Lai A. et al. (2017). Identification of 4-(Aminomethyl)-6-(trifluoromethyl)-2-(phenoxy) pyridine Derivatives as Potent, Selective, and Orally Efficacious Inhibitors of the Copper-Dependent Amine Oxidase, Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2). *Journal of medicinal chemistry*, 60(10), 4403–23. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00345>
- Calvaresi, E. C., & Hergenrother, P. J. (2013). Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chemical science*, 4(6), 2319–2333. <https://doi.org/10.1039/C3SC22205E>

## Food Labeling - Knowledge among university students in the Lisbon region: an exploratory study

### Rotulagem alimentar - Conhecimento de estudantes universitários: um estudo exploratório

Leandro Oliveira <sup>1</sup>  , Catarina Manoel <sup>2</sup>, Márcia Ribeiro <sup>2</sup>, Diogo Pedro <sup>2</sup>, Catarina Simões Rodrigues <sup>2</sup>, and  
Carina Rossoni <sup>2,3</sup>  

**Keywords:** food labeling, students, nutrition claims, nutritional information, nutrition

**Palavras-chave:** rotulagem alimentar, estudantes, alegações nutricionais, informação nutricionais, nutrição

#### To Cite:

Oliveira, L., Manoel, C., Ribeiro, M., Pedro, D., Simões Rodrigues, C., Rossoni, C. (2023) Food Labeling - Knowledge among university students in the Lisbon region: an exploratory study. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 25-36.

 [10.19277/bbr.20.1.306](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.306)

1 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

2 - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

3 - Universidade de Lisboa – Instituto de Saúde Ambiental da Faculdade de Medicina, Avenida Professor Egas Moniz, 1649-028 Lisboa - Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[p6665@ulusofona.pt](mailto:p6665@ulusofona.pt) (L. O.);  
[p6264@ulusofona.pt](mailto:p6264@ulusofona.pt) (C. R.)

Received / Recebido: 28/02/2023  
Accepted / Aceite: 16/05/2023

#### Abstract

Food labeling is important for consumers to have access to accurate nutritional information and to guide them in choosing healthier foods, but its correct understanding and use by consumers is equally important. This study aims to assess higher education students' knowledge of labeling and relate it to demographic factors. This is an exploratory observational study whose data collection was carried out through an online questionnaire, in the period between November and December 2022. In this study, 124 higher education students participated, mostly female (74.2%), living in the Lisbon metropolitan area (97.9%), who did not practice physical exercise/sport (98.4%), and who had no type of food allergy or disease (84.7%). The mean age of the participants was  $20.1 \pm 1.9$  years old. The mean score for knowledge about food labeling was  $5 \pm 1.8$ , with a maximum of 8 points. No relationship was found between knowledge about labeling with demographic characteristics. However, the results point to the need to increase knowledge about food labeling, as well as about the interpretation of nutritional information.

#### Resumo

A rotulagem alimentar é importante para que os consumidores tenham acesso a informações nutricionais precisas e que os orientem na escolha por alimentos mais saudáveis, contudo é igualmente importante a sua correta compreensão e utilização por parte dos consumidores. O objetivo deste estudo é avaliar os conhecimentos dos estudantes do ensino superior sobre rotulagem e relacioná-los com fatores demográficos. Trata-se de um estudo observacional exploratório cuja recolha de dados foi efetuada por um questionário online, no período entre novembro e dezembro de 2022. Participaram neste estudo 124 estudantes do ensino superior, maioritariamente do sexo feminino (74,2%), residentes na área metropolitana de Lisboa (97,9%), que não praticavam exercício físico/ desporto (98,4%), e não tinham qualquer tipo de alergia alimentar ou doença (84,7%). A média de idade dos participantes era de  $20,1 \pm 1,9$  anos. A média da pontuação do conhecimento sobre rotulagem alimentar foi de  $5 \pm 1,8$ , num máximo de 8 pontos. Não foi encontrada nenhuma relação entre o conhecimento sobre rotulagem com características demográficas. Contudo, os resultados apontam para a necessidade aumentar o conhecimento sobre rotulagem alimentar, bem como sobre a interpretação das informações nutricionais.

## Introduction

Food labeling can serve as an economical tool for providing nutritional information and communication to consumers at the point of purchase, helping them make more informed and healthier food choices (1). However, some consumers are influenced by labeling to consume certain trendy foods (e.g., functional foods) that they may not necessarily need, believing that these foods are healthier (2). In general, food labeling includes the nutrition facts table, serving size, and ingredient list, which are used to communicate basic nutritional information. Currently, information about the nutritional composition and health benefits has been increasingly highlighted on packaging, resulting in more sophisticated food labeling. Examples include the inclusion of nutrition fact panels, nutritional traffic light systems, logos, and nutritional and health claims on the front of the packaging (3).

The literature has shown that there are various determinants of food label use, such as sex, age, level of education, health and nutrition knowledge, among others (4-6). According to the study conducted by Shangguan *et al.* (2019) (6), which consisted of a meta-analysis compiling intervention studies assessing various exposures to food labels, food labels had a positive impact on subsequent food consumption. The results showed a reduction in energy intake by 6.6%, total fat intake by 10.6%, and consumption of other unhealthy foods by 13.0% (including sugary beverages, alcoholic beverages, potato chips, and white bread). Additionally, the consumption of vegetables increased by 13.5%.

In this sense, specific consumer groups like young adults can be a target for the implementation of strategies that utilize food labeling to promote healthier food choices. By tailoring food labeling initiatives to address the unique needs and preferences of young adults, it is possible to effectively encourage them to make more informed and healthier choices regarding their dietary habits (1,7). The transition of young adults to higher education represents a phase of transition into adulthood, during which time some healthy behaviors may be lost due to adaptation to a new environment, academic pressure, and economic factors (7). This can lead to the development of unhealthy habits and behaviors, such as increased consumption of foods high in sugar, fat, and salt, and decreased consumption of fruits and vegetables (7).

## Introdução

A rotulagem alimentar pode consistir uma ferramenta económica de informações nutricionais e de comunicação para os consumidores no ato da compra e ajudá-los a fazer escolhas alimentares mais consistentes e saudáveis (1). Contudo, alguns consumidores são influenciados pela rotulagem a consumir determinados alimentos que não necessitam, apenas por estarem na moda (por exemplo, alimentos funcionais), acreditando que esses alimentos são mais saudáveis (2). De um modo geral, a rotulagem dos alimentos inclui a tabela de informação nutricional, o tamanho da porção, e lista de ingredientes, que são usados para comunicar informações nutricionais básicas. Atualmente, informações sobre a composição nutricional e os benefícios para a saúde têm sido cada vez mais destacadas nas embalagens, resultando numa rotulagem alimentar mais sofisticadas, por exemplo através das inclusão de painéis com factos nutricionais, semáforos nutricionais, logotipos, alegações nutricionais e de saúde na frente da embalagem (3).

A literatura tem mostrado que existem vários determinantes da utilização dos rótulos alimentares como o sexo, a idade, o nível de escolaridade, o conhecimento em saúde e nutrição, entre outros (4-6). Segundo o trabalho de Shangguan *et al.* (2019) (6), que consistiu numa meta-análise que compilou estudos de intervenção que avaliavam várias exposições a rótulos alimentares, os rótulos alimentares tiveram um impacto positivo no consumo posterior de alimentos, incluindo a redução da ingestão energética (6,6%), ingestão total de gordura (10,6%), outros alimentos não saudáveis (13,0 % — incluindo bebidas açucaradas, bebidas alcoólicas, batatas fritas, e pão branco), e aumentou o consumo de vegetais (13,5%).

Neste sentido, grupos específicos de consumidores, como jovens adultos, podem ser um alvo para a implementação de estratégias em que se utiliza a rotulagem alimentar para promover escolhas alimentares mais saudáveis (1,7). A entrada dos jovens no ensino superior representa uma fase de transição para a vida adulta, na qual alguns comportamentos saudáveis podem ser perdidos devido à adaptação a um novo ambiente, pressão académica e aspetos económicos (7). Isto pode levar a hábitos e comportamentos menos saudáveis como o maior consumo de alimentos ricos em açúcar, gordura e sal, e diminuição do consumo de

In fact, according to a meta-analysis, nearly two-thirds of higher education students experience weight gain during their time in university, and the rate of weight gain is higher compared to the general population (8). Some studies in young adults have shown that the use of food labeling has been associated with healthier eating choices, mainly due to their choosing fewer foods rich in energy, fat, and sodium, such as salty snacks and desserts, and increased choice for foods with greater fiber content, such as fruits and vegetables and whole grains (7). However, it is important to note that the percentage of young adults/university students who consult the nutritional information on food labels is low (4,7). Furthermore, the literature regarding the use, knowledge, and interpretation of food and nutritional labeling in Portugal is scarce, especially concerning young adults and university students.

Thus, it becomes important to assess the knowledge and interpretation of food labeling among young adults and university students in order to develop strategies that can improve their food choices. Therefore, the aim of this study is to evaluate the knowledge of university students regarding food labeling and relate them to demographic factors.

## **Materials and Methods**

### *Procedure and sample*

This is a cross-sectional, exploratory study with a quantitative approach whose sample consisted of higher education students at Universidade Lusófona in Lisbon, Portugal. The inclusion criteria for participation in the study were: to be  $\geq 18$  years old, and to be attending Universidade Lusófona for two semesters. For data collection, an online questionnaire (available between November and December 2022) was used through the GoogleForms® platform, and all data were self-reported. An invitation was made by social networks to participate in the study, including a direct link to the questionnaire. Thus, a non-probabilistic snowball sampling was used.

The questionnaire, in Portuguese, was comprised of two sections: demographic and health

hortofrutícolas (7). De facto, segundo uma meta-análise, quase dois terços dos estudantes do ensino superior aumentam de peso durante a universidade, sendo que a taxa de aumento de peso é superior à da população em geral (8). Alguns estudos em jovens adultos tem demonstrado que a utilização da rotulagem alimentar tem sido associada a escolhas alimentares mais saudáveis, principalmente devido à menor escolha de alimentos ricos em energia, gordura, e sódio, como snacks salgados, sobremesas, e maior escolha por alimentos com maior teor de fibra alimentar, como as frutas e vegetais, e cereais integrais (7). Contudo, importa ainda referir que a percentagem de jovens adultos/ universitários que consulta as informações nutricionais que constam nos rótulos dos alimentos é baixa (4,7). Além disso, a literatura referente à utilização e conhecimento e interpretação de rotulagem alimentar e nutricional em Portugal é escassa, especialmente a que se refere a adultos jovens/ estudantes universitários.

Deste modo, torna-se importante avaliar os conhecimentos e a interpretação da rotulagem alimentar por parte dos jovens adultos/ universitários com vista ao desenvolvimento de estratégias capazes de melhorar as suas escolhas alimentares. Assim, o objetivo este estudo é avaliar os conhecimentos dos estudantes universitários sobre rotulagem alimentar e relacioná-los com fatores demográficos.

## **Material e Métodos**

### *Procedimento e amostra*

Este é um estudo transversal, exploratório e de abordagem quantitativa cuja amostra consistiu em estudantes do ensino superior da Universidade Lusófona em Lisboa, Portugal. Os critérios de inclusão para participação no estudo foram: ter uma  $\geq 18$  anos, e estar a frequentar a Universidade Lusófona há dois semestres. Para a recolha de dados foi utilizado um questionário online (disponível entre novembro e dezembro de 2022), através da plataforma GoogleForms®, e todos os dados foram autorreportados. Foi feito um convite pelas redes sociais para participação no estudo, este incluía um link direto para o questionário. Deste modo, foi utilizada uma amostragem não probabilística do tipo bola de neve.

O questionário, em Língua Portuguesa, compreendia as duas secções: caracterização demográfica e de

characterization (sex, age, place of residence, practice of physical exercise, existence of any food allergy or disease, etc.) and knowledge about food labeling, based on a study developed by Morais *et al.* (2020) (9), which originally included 24 questions related to the following dimensions: meaning of nutrition claims, interpretation of nutrition information, and label interpretation of ingredient list and serving size/nutrient content. Correct answers were counted with one point each, to a maximum of 24 points. In our questionnaire, eight questions were selected to assess knowledge regarding the dimensions of "nutrition claims" and "meaning and interpretation" of food labels. Correct answers were awarded 1 point and wrong answers 0 points (maximum score: 8 points). In addition, we added two more questions: 1. "If the packaging of a food claims to be "fat free", will you check its nutritional information on the label?"; 2. "Considering that the packaging of a food is attractive, what is the tendency to verify its nutritional information?".

#### *Ethical considerations*

This study was carried out following the ethical norms established in the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent amendments or comparable ethical norms. The protocol, considering all the principles of good practice in human research, was previously submitted to the institutional Ethics Committee. Information about the study was provided to all volunteers and an informed consent was provided in which the objective and protocol of the study were explained in detail, confidentiality and exclusive use of the data collected for the present study were guaranteed, with the data being treated in a way that guaranteed anonymity.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis of the present study was performed using the IBM SPSS Statistics software, version 26 for Windows. Descriptive statistics consisted of calculating the absolute (n) and relative (%) frequencies and calculating the mean  $\pm$  standard deviation for the quantitative variables. Fisher's exact test was used to assess independence between pairs of variables, the Mann-Whitney test to compare mean orders between independent samples. Spearman's correlation coefficient (*r*) was used to assess the degree of association between pairs of continuous variables. The null hypothesis was rejected when  $p < 0.05$ .

saúde (sexo, idade, local de residência, prática de exercício físico, existência de alguma alergia alimentar ou doença, etc.) e conhecimento sobre rotulagem alimentar, baseado num estudo desenvolvido por Morais *et al.* (2020) (9), que tinha originalmente 24 perguntas relacionadas com as seguintes dimensões: significado das alegações nutricionais, interpretação da informação nutricional, e interpretação do rótulo quanto à lista de ingredientes e tamanho da porção/teor do nutriente. As respostas certas eram cotadas com um ponto até ao máximo de 24 pontos. No nosso questionário, foram seleccionadas oito perguntas para avaliar os conhecimentos relativos às dimensões "alegações nutricionais" e "significado e interpretação" dos rótulos dos alimentos. Às respostas certas foi atribuído 1 ponto e às erradas 0 pontos (pontuação máxima: 8 pontos). Além disso, foram adicionadas mais duas questões: 1. "Se a embalagem de um alimento alegar ser "magro", vai verificar a sua informação nutricional no rótulo?"; 2. "Considerando que a embalagem de um alimento é atrativa, qual a tendência para verificar a sua informação nutricional?".

#### *Considerações éticas*

Este estudo foi realizado seguindo as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsínquia de 1964 e as suas posteriores emendas ou normas éticas comparáveis. O protocolo, observando todos os princípios da boa prática de investigação em humanos, foi previamente submetido a Comissão de Ética institucional. Foram disponibilizadas informações a todos os voluntários sobre o estudo e um consentimento informado onde se explicou detalhadamente o objetivo e protocolo do estudo, foi-lhes garantida a confidencialidade e o uso exclusivo dos dados recolhidos para o presente estudo, sendo os dados tratados de forma a garantir o seu anonimato.

#### *Análise estatística*

A análise estatística do presente estudo foi realizada por recurso ao software IBM SPSS Statistics, versão 26 para Windows. A estatística descritiva consistiu no cálculo das frequências absolutas (n) e relativas (%) e no cálculo da média e desvio-padrão (d.p) para as variáveis quantitativas. O teste exato de Fisher foi usado para avaliar a independência entre pares de variáveis, o teste de Mann-Whitney para comparar ordens médias entre amostras independentes. O coeficiente de correlação de Spearman (*r*) foi utilizado para avaliar o grau de associação entre pares de variáveis contínuas. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ .

**Table 1** - Interpretation of food labeling and use of nutritional information (n=124).

**Tabela 1** – Interpretação da rotulagem alimentar e utilização da informação nutricional (n=124).

	n (124)	%
<b>If you are faced with a food label, do you know how to interpret it?/ Se estiver perante um rótulo alimentar, sabe interpretá-lo?</b>		
Yes / Sim	83	66.9
No / Não	41	33.1
<b>If a food package claims to be "fat free", will you check its nutritional information on the label?/ Se a embalagem de um alimento mencionar ser "magro", vai verificar a sua informação nutricional no rótulo?</b>		
Yes / Sim	71	57.3
No / Não	53	42.7
<b>Considering that the packaging of a food is attractive, what is your tendency to verify its nutritional information?/ Considerando que a embalagem de um alimento é atrativa, qual a sua tendência para verificar a sua informação nutricional?</b>		
Lower tendency / Menor tendência	32	25.8
Same tendency / Mesma tendência	27	21.8
Higher tendency / Maior tendência	65	52.4

## Results

In this study, 124 individuals participated, the majority of whom were female (74.2%). They lived in the metropolitan area of Lisbon (97.9%), did not engage in physical exercise/sports (98.4%), and reported having no food allergies (84.7%). The mean age of participants was  $20.1 \pm 1.9$  years old. The analysis, performed using Fisher's exact test, did not reveal any significant differences in sex and place of residence ( $p=0.758$ ), practicing physical exercise/sport ( $p=0.451$ ), or having food allergies ( $p=0.573$ ), so the data were not presented separately. However, there was a difference in mean age between sexes ( $p=0.038$ ), with the mean age of females ( $19.9 \pm 1.8$  years) being lower than that of males ( $20.7 \pm 2.0$  years).

The results of the questions related to the interpretation of food labeling and the use of nutritional information are presented in Table 1. The majority of participants responded that they know how to interpret a food label if they are presented with one (66.9%). Additionally, 57.3% of participants indicated that they would check the nutritional information on the label if the packaging mentions that the food is "fat-free", and 52.4% stated that they are more likely to check the nutritional information if they find the packaging of the food attractive.

## Resultados

Neste estudo participaram 124 indivíduos sendo que a maioria destes era do sexo feminino (74,2%), residia na área metropolitana de Lisboa (97,9%), não praticava exercício físico/ desporto (98,4%), e não tinha qualquer tipo de alergia alimentar (84,7%). A média de idade dos participantes  $20,1 \pm 1,9$  anos. A análise realizada através do teste exato de Fisher não revelou diferenças entre o sexo e local de residência ( $p=0,758$ ), praticar exercício físico/ desporto ( $p=0,451$ ), e ter alguma alergia alimentar ( $p=0,573$ ), pelo que os dados não foram apresentados em separado. Contudo, existe uma diferença na média de idades em relação ao sexo ( $p=0,038$ ), a média de idade do sexo feminino  $19,9 \pm 1,8$  anos é inferior à do sexo masculino  $20,7 \pm 2,0$  anos.

Os resultados para as questões sobre a interpretação da rotulagem alimentar e utilização da informação nutricional são apresentados na Tabela 1. A maioria dos participantes afirma que: se estiver perante um rótulo alimentar, sabe interpretá-lo (66,9%); se a embalagem de um alimento mencionar ser "magro", vai verificar a sua informação nutricional no rótulo (57,3%); e se considerar que a embalagem de um alimento é atrativa, têm maior tendência para verificar a sua informação nutricional (52,4%).



Table 2 displays the results of the assessment of student's knowledge of food labeling. The majority of participants responded that "functional food" on a label indicates that the product can produce beneficial physiological effects on health (66.9%), "contains gluten" on the front label of a product indicates that the product contains a protein present in cereals that can cause allergic reactions when consumed (72.6%), and "zero (0%) trans-fat" on the front label of a food indicates that the product is totally free of trans fat (53.2%). In terms of the meaning and interpretation of food labeling, the majority of participants responded that ingredients are listed in descending order based on their quantity in the product (69.4%), "diet" foods are intended for nutrient-restricted diets, which can be carbohydrates, fats, proteins or sodium (54.0%), and the statement "light" foods only have a reduction in calories is false (63.7%). Additionally, most participants responded that a food without added sugar only contains sugar naturally present in its ingredients (91.9%) and that a product labeled as both an "enriched food" and a "nutrient replacement food" indicates that iron, vitamins A, C, and D were added to the product that were already naturally present (41.9%). The mean score for knowledge about food labeling was  $5 \pm 1.8$ , with a maximum of 8 points.

A relationship was found between knowledge about food labeling and the question "if you are faced with a food label, do you know how to interpret it?" ( $p=0.035$ ), and participants who claimed to know how to interpret labels obtained a higher score ( $5.2 \pm 1.4$  points) than the counterpart

( $4.6 \pm 1.5$  points.)

No relationship was found between knowledge about food labeling and sex ( $p=0.364$ ), age ( $r: 0.049$ ;  $p=0.592$ ), place of residence ( $p=0.640$ ), having any type of food allergy or disease ( $p=0.405$ ).

Na Tabela 2 é apresentada a avaliação do conhecimento dos estudantes sobre rotulagem alimentar. No que respeita às alegações nutricionais, a maioria dos participantes considera que: ao ler num rótulo a expressão "alimento funcional", o produto pode produzir efeitos fisiológicos benéficos à saúde (66,9%); ao ler a expressão "contém glúten" no rótulo frontal de um produto, o produto contém uma proteína, presente em cereais e ao ser consumida, pode causar reações alérgicas (72,6%); no rótulo frontal de um alimento, quando há a alegação "zero (0%) gordura trans" pode-se afirmar que o produto é totalmente isento de gordura trans (53,2%). Quanto ao significado e interpretação da rotulagem alimentar, a maioria dos participantes considera que: os ingredientes são apresentados em ordem decrescente, isto é, o primeiro ingrediente é aquele que está em maior quantidade e o último, em menor quantidade no produto (69,4%); os alimentos "diet" são aqueles destinados a dietas com restrição de nutrientes, que podem ser hidratos de carbono, gorduras, proteínas ou sódio (54,0%); a afirmação "alimentos "light" são aqueles que possuem uma redução apenas em calorias" é falsa (63,7%); um alimento sem adição de açúcares é um alimento que só contém o açúcar naturalmente presente nos seus ingredientes (91,9%); baseada na informação do rótulo apresentado, o produto é ao mesmo tempo um "alimento enriquecido" e um "alimento com reposição de nutrientes", no qual foram adicionados ferro, vitaminas A, C, e D que já estavam presentes no produto naturalmente (41,9%). A média da pontuação do conhecimento sobre rotulagem alimentar foi de 5 (d.p.=1,5), num máximo de 8 pontos.

Foi encontrada uma relação entre o conhecimento sobre rotulagem alimentar com a questão "se estiver perante um rótulo alimentar, sabe interpretá-lo?" ( $p=0,035$ ), sendo que participantes que afirmaram saber interpretar rótulos obtiveram uma maior pontuação ( $5,2 \pm 1,4$  pontos) face à contraparte ( $4,6 \pm 1,5$  pontos.)

Não foi encontrada nenhuma relação entre o conhecimento sobre rotulagem alimentar com o sexo ( $p=0,364$ ), idade ( $r: 0,049$ ;  $p=0,592$ ), local de residência ( $p=0,640$ ), possuir algum tipo de alergia alimentar ou doença ( $p=0,405$ ).

**Table 2** - Assessment of knowledge about food labeling (n=124). Answers considered correct according to Morais et al. (9) are indicated with an asterisk (\*).

**Tabela 2** - Avaliação do conhecimento sobre rotulagem alimentar (n=124). As respostas consideradas correctas de acordo com Morais et al. (9) estão indicadas com um asterisco (\*)

	n	%
<i>Nutritional Claims / Alegações nutricionais</i>		
<b>When reading the expression "Functional Food" on a label, you understand that: / Ao ler num rótulo a expressão "Alimento Funcional", entende que:</b>		
The product may have beneficial health effects, but it is not scientifically proven. / O produto pode exercer efeitos benéficos à saúde, mas não é cientificamente comprovado.	34	27.4
The product may produce beneficial physiological effects on health. / O produto pode produzir efeitos fisiológicos benéficos à saúde.*	83	66.9
The product prevents against specific diseases, such as high blood pressure. / O produto previne contra doenças específicas, como hipertensão arterial.	7	5.7
<b>When you read the expression "Contains gluten" on the front label of a product, you understand that: / Ao ler a expressão "Contém glúten" no rótulo frontal de um produto, entende que:</b>		
The product contains gluten, a protein present in food products of animal origin, which when consumed can cause allergic reactions. / O produto contém glúten, uma proteína presente em produtos alimentares de origem animal, e que ao ser consumida pode causar reações alérgicas.	18	14.5
The product contains gluten, a protein present in cereals and when consumed can cause allergic reactions. / O produto contém glúten, uma proteína, presente em cereais e ao ser consumida, pode causar reações alérgicas.*	90	72.6
The product may contain gluten, a protein present in products of vegetable origin, and when consumed, it may cause allergic reactions. / O produto pode conter glúten, uma proteína, presente em produtos de origem vegetal, e ao ser consumida, pode causar reações alérgicas.	16	12.9
<b>On the front label of a food, when there is the claim "zero (0%) trans fat", it can be stated that the product is completely free of trans fat. / No rótulo frontal de um alimento, quando há a alegação "zero (0%) gordura trans" pode-se afirmar que o produto é totalmente isento de gordura trans.</b>		
True / Verdadeiro	66	53.2
False / Falso*	58	46.8
<i>Meaning and interpretation / Significado e interpretação</i>		
<b>Regarding the list of ingredients on food labels, mark the correct alternative. / Sobre a lista de ingredientes presente nos rótulos dos alimentos, assinale a alternativa correta.</b>		
The ingredients are presented in descending order, that is, the first ingredient is the one that is in greater quantity and the last, in smaller quantity in the product. / Os ingredientes são apresentados em ordem decrescente, isto é, o primeiro ingrediente é aquele que está em maior quantidade e o último, em menor quantidade no produto.*	86	69.4
The ingredients are presented in ascending order, that is, the first ingredient is the one that is in the smallest amount in the product and the last one, in the largest amount. / Os ingredientes são apresentados em ordem crescente, isto é, o primeiro ingrediente é aquele que está em menor quantidade no produto e o último, em maior quantidade.	23	18.5
For the description of ingredients, the manufacturer randomly selects the arrangement of ingredients from the list on the product label. / Para a descrição dos ingredientes, o fabricante seleciona aleatoriamente a disposição dos ingredientes na lista presente no rótulo do produto.	15	12.1
<b>When reading a package where the food is considered "diet", you understand that: / Ao ler uma embalagem em que o alimento é considerado "diet", entenderia que:</b>		
The expression "diet" on food packaging necessarily means that the product does not contain sugar. / A expressão "diet" nas embalagens dos alimentos significa necessariamente que o produto não contém açúcar.	11	8.9
"Diet" foods are those intended for nutrient-restricted diets, which can be carbohydrates, fats, proteins or sodium. / Os alimentos "diet" são aqueles destinados a dietas com restrição de nutrientes, que podem ser hidratos de carbono, gorduras, proteínas ou sódio.*	67	54
"Diet" products are the same as "light" foods. That is, it has no added sugar and fat. / Os produtos "diet" são a mesma coisa que os alimentos "light". Ou seja, não tem açúcar e gordura adicionados.	46	37.1

Table 2 - Continued / Tabela 2 - Continuação

	n	%
<i>Meaning and interpretation (continued) / Significado e interpretação (continuação)</i>		
<b>"Light" foods are those that have a reduction in calories only. / Alimentos "light" são aqueles que possuem uma redução apenas em calorias.</b>		
True / Verdadeiro	45	36.3
False / Falso*	79	63.7
<b>Regarding "Enriched Foods" and "Foods with Nutrient Replacement", observe the front label of the product and mark the correct alternative: / Sobre os "Alimentos Enriquecidos" e "Alimentos com reposição de Nutrientes" observe o rótulo frontal do produto e assinale a alternativa correta:</b>		
It is at the same time an "Enriched Food" and a "Nutrient Replacement Food", in which iron, vitamins A, C and D that were already naturally present in the product were added. / É ao mesmo tempo um "Alimento Enriquecido" e um "Alimento com Reposição de nutrientes", no qual foram adicionados ferro, vitaminas A, C e D que já estavam presentes no produto naturalmente.	52	41.9
It is a "Nutrient Replacement Food", in which the amount of iron, vitamins A, C and D that were naturally present in the product was restored. / É um "Alimento com Reposição de nutrientes", no qual foi restaurada a quantidade de ferro, vitaminas A, C e D que já estavam presentes no produto naturalmente.	26	21
It is an Enriched Food, in which iron, vitamins A, C and D have been added to enrich the nutritional value of the product. / É um Alimento Enriquecido, no qual foi adicionado ferro, vitaminas A, C e D para o enriquecimento do valor nutricional do produto.*	46	37.1
<b>What do you understand about a food without added sugars? / O que entende por um alimento sem adição de açúcares?</b>		
Food that does not contain any type of sugar / Alimento que não contém qualquer tipo de açúcar.	10	8.1
Food that only contains the sugar naturally present in its ingredients / Alimento que só contém o açúcar naturalmente presente nos seus ingredientes.*	114	91.9
	Mean / Média	Standard-deviation / Desvio-padrão
<b>Score "knowledge about food labeling" (maximum: 8 points) / Pontuação "conhecimento sobre rotulagem" (máximo: 8 pontos)</b>	<b>5</b>	<b>1.5</b>

## Discussion

This study aimed to assess knowledge about food labeling using students attending Lusófona University (Lisbon, Portugal) as a sample. In general, the participants stated that when faced with a food label, they knew how to interpret it. However, evaluating their knowledge, the average score obtained was slightly higher than the midpoint of the scale used.

The results presented are more satisfactory than those outlined in a previous study on food labeling conducted in Portugal, which reported that only 20% of consumers (n=467) were able to comprehend all the information provided on the label. These findings highlight the persistent challenges faced regarding consumer understanding and proper utilization of food labeling information (5). A study conducted with university students in Chongqing, China (4) revealed

## Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar o conhecimento sobre a rotulagem alimentar tendo usado como amostra estudantes a frequentar a Universidade Lusófona (Lisboa, Portugal). De um modo geral dos participantes afirmaram que perante um rótulo alimentar, sabiam interpretá-lo. Porém, avaliando os seus conhecimentos a pontuação média obtida foi um pouco superior ao ponto médio da escala utilizada.

Estes resultados apresentam-se mais satisfatórios do que aos descritos num estudo português sobre rotulagem alimentar que reporta que apenas 20% dos consumidores (n=467) compreende todas as informações presentes no rótulo, tendo-se percebido que existem desafios quanto à compreensão do consumidor acerca das informações presentes no rótulo, bem como no seu uso adequado (5). Bem como a outro estudo realizado em estudantes universitários em Chongqing, China (4) reportou

low levels of knowledge regarding food labeling and its use. Only 21.3% of university students knew how to interpret a food label, and 48.4% utilized or consistently used nutrition labels. Notably, medical students exhibited higher levels of knowledge than students enrolled in other courses.

According to the study by Silva *et al.* (2022) (5), female individuals show greater concern when buying food, taking longer to make their choices, and reporting that labels influence their food choices. Another study (4) reports that females are more likely to understand the nutrition labels of prepackaged foods, and compared to junior college participants, senior college and graduate school participants had a higher probability of understanding food nutrition labels for prepackaged items. In our study, no relationship was found between demographic characteristics and knowledge of food labeling. However, finding a higher level of knowledge among female participants would be expected, as described in other studies. This result may be because now males are also increasingly concerned about their health, and are more careful with their nutrition, as well as other health and wellness issues.

Regarding nutritional claims, it was found that most students were familiar with the meaning of "contains gluten" and "functional food", similar to another study (9) with Brazilian consumers (n=418), recruited at a university. On the other hand, most university students in our study mistakenly considered that when there is a claim "zero (0%) trans-fat" it can be said that the product is completely free of trans fat, as in the Brazilian study (9). Indeed, according to Portuguese legislation, a claim that a food "does not contain saturated fat" can only be made when the sum of saturated fat and trans fatty acids does not exceed 0.1 g of saturated fat per 100 g or per 100 ml of the food (10). Therefore, this claim does not mean that the food is completely free of trans fat, but rather that the amount present in that food is not considered significant enough to use other terminology, as stated Morais *et al.* (9).

que os conhecimentos sobre rótulos alimentares e a sua utilização eram baixos, nomeadamente, apenas 21,3% dos universitários sabiam interpretar um rótulo alimentar, e 48,4% costumava utilizar ou utilizava sempre os rótulos nutricionais. Verificaram ainda que os estudantes de medicina tinham mais conhecimentos do que os estudantes de outros cursos.

Segundo o estudo de Silva *et al.* (2022) (5) os indivíduos do sexo feminino têm uma maior preocupação no momento de compra dos alimentos, e demoram mais tempo para fazerem as suas escolhas, relatando que os rótulos influenciam as suas escolhas alimentares. Outro estudo (4) reporta que indivíduos do sexo feminino são mais propensas a entender os rótulos nutricionais dos alimentos pré-embalados, e que em comparação com os participantes universitários juniores, os participantes universitários seniores e de pós-graduação tiveram uma alta probabilidade de compreensão dos rótulos nutricionais dos alimentos pré-embalados. No nosso estudo não foram encontradas relações entre as características demográficas os conhecimentos sobre a rotulagem dos alimentos, porém, seria expectável um maior conhecimento por parte do sexo feminino, tal como descrito noutros estudos. Isto pode dever-se ao facto de cada vez mais o sexo masculino também se preocupar com a sua saúde, serem mais cuidadosos com a sua alimentação, e outras questões de saúde e bem-estar.

Em relação às alegações nutricionais, verificou-se que a maioria dos estudantes conheciam o significado de "contém glúten" e "alimento funcional", tal como noutro estudo (9) com consumidores brasileiros (n=418), recrutados numa universidade. Por outro lado, a maioria dos estudantes universitários do nosso estudo considerou, de forma errada que quando há a alegação "zero (0%) gordura trans" pode-se afirmar que o produto é totalmente isento de gordura trans, tal como no estudo brasileiro (9). De facto, de acordo com a legislação portuguesa, uma alegação de que um alimento "não contém gordura saturada", só pode ser feita quando a soma da gordura saturada e dos ácidos gordos trans não exceder 0,1 g de gordura saturada por 100 g ou por 100 ml de alimento (10). Deste modo, esta alegação não quer dizer que alimento esteja totalmente isento ou livre de "gordura trans", mas sim que a quantidade presente nesse alimento não é considerada significativa o suficiente para o uso de outra terminologia, tal como refere Morais *et al.* (9).

Regarding "diet" and "light" foods, the understanding of the university students assessed in this study was lower than that found in a study with university students in Brazil (9). However, in relation to enriched foods, the knowledge of our sample was slightly lower compared to the same Brazilian study. Regarding comparative claims, it is necessary that the products being compared are clearly indicated to the end consumer (10). Although regulated, these terms may still be unfamiliar to consumers, as generally, the Portuguese consumer does not have a high level of knowledge about food labeling (5).

Finally, it is important to emphasize that although the knowledge about food labeling found in this study was slightly above the midpoint of the scale, further clarification is needed for this population group, as there are difficulties in understanding and interpreting nutritional labeling, even basic concepts. In this sense, other studies have already reported the need for nutritional information on food packaging to be simpler and clearer, allowing consumers to choose their foods more consciously and with a view to promoting their health and well-being (1,5,9). Thus, these results point to the need for interventions to improve knowledge about labeling, whether through awareness campaigns using social media or printed materials such as posters or brochures distributed on campus. Another interesting form of intervention would be the development of workshops on reading and interpreting food labels.

#### *Limitations and future directions*

This study has some limitations, such as its cross-sectional nature, which does not allow for the extrapolation of results, the small number of participants, and the sampling method used. However, it is important to note that this is an exploratory study that allowed for a first approach to the issue of food labeling among university students in Portugal. As for future studies, it would be important to evaluate other dimensions related to knowledge about food labeling, such as the obligation or not of certain nutritional information, and the interpretation of information on the label related to nutritional information. It would also be important to study students' perceptions of the usefulness and importance of nutritional information, as well as its use. Another aspect to be considered in future research is the distinction between students by type of course (health vs. non-health) and to verify if there are differences between these two groups.

No que concerne aos alimentos "diet" e "light", a compreensão dos estudantes universitários avaliados neste estudo foi superior menor à encontrada num estudo com estudantes universitários no Brasil (9). Já em relação aos alimentos enriquecidos, o conhecimento da nossa amostra foi ligeiramente inferior em relação a esse mesmo estudo brasileiro. Em relação às alegações comparativas, é necessário que os produtos alvo da comparação sejam claramente indicados ao consumidor final (10). Apesar de legislados, estes termos podem ainda ser desconhecidos uma vez que de um modo geral o consumidor português não possui um elevado nível de conhecimentos sobre rotulagem (5).

Por fim, é importante realçar que embora o conhecimento sobre a rotulagem alimentar encontrado neste estudo tenha sido ligeiramente superior ao ponto médio da escala, é necessário um maior esclarecimento deste grupo populacional, uma vez que existem dificuldades de compreensão e interpretação da rotulagem nutricional, mesmo de conceitos básicos. Neste sentido, já outros estudos têm reportado a necessidade de a informação nutricional nas embalagens dos alimentos serem mais simples e claras, e que permitam o consumidor escolher os seus alimentos de forma mais consciente e com vista à promoção da sua saúde e bem-estar (1,5,9). Assim, estes resultados apontam para a necessidade do desenvolvimento de intervenções com vista a melhorar o seu conhecimento sobre rotulagem, quer seja através de campanhas de sensibilização utilizando as redes sociais, quer por materiais impressos como cartazes ou folhetos distribuídos na universidade. Outra forma de intervenção interessante seria o desenvolvimento de workshops de leitura e interpretação de rótulos.

#### *Limitações e futuras direções*

Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente o seu carácter transversal que não permite a extrapolação dos resultados. O reduzido número de participantes e o próprio tipo de amostragem. Contudo, é de realçar que este é um estudo exploratório que permitiu uma primeira aproximação à temática da rotulagem alimentar em estudantes universitários em Portugal. Como futuros estudos seria importante avaliar outras dimensões relativas ao conhecimento sobre rotulagem, por exemplo, obrigatoriedade ou não de determinadas informações nutricionais, e a interpretação das informações constantes no rótulo relativas a informações nutricionais. Seria também importante estudar a perceção dos estudantes sobre a utilidade e importância das informações nutricionais, bem

## Conclusion

Approximately 70% of the participants stated that they are able to interpret food labeling, however, the average score for knowledge about food labeling was  $5 \pm 1.5$  out of 8 points. Participants who claimed to be able to interpret labels obtained a higher score than those who admitted not being able to interpret them. No relationship was found between knowledge about labeling and sociodemographic characteristics. Further studies are needed to obtain more solid conclusions on this subject. However, the results point to the need to increase knowledge about food labeling, as well as about the interpretation of nutritional information. It is suggested that food education campaigns be developed to increase students' knowledge about food labeling, so that they can make more conscious and informed choices.

## Authors Contributions Statement

LO, CM, MR, DP, and CSR, conceptualization and study design; CM, MR, DP, CSR, data collection; LO, data analysis; LO, drafting and editing; LO and CR reviewing; LO, tables; LO and CR, supervision and final writing.

## Funding

Not applicable.

## 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.

como a sua utilização. Outro aspeto a ter em conta futuramente é a distinção entre os alunos pela tipologia de curso (saúde versus não saúde) e verificar se existem diferenças entre estes dois grupos.

## Conclusões

Cerca de 70% dos participantes afirmou que sabe interpretar a rotulagem alimentar, contudo a pontuação média dos conhecimentos sobre rotulagem alimentar foi que  $5 \pm 1,5$  em 8 pontos. Participantes que afirmaram saber interpretar rótulos obtiveram uma maior pontuação do que os que admitiram não saber interpretá-los. Não foi encontrada nenhuma relação entre o conhecimento sobre rotulagem com características sociodemográficas. Considera-se necessária a realização de mais estudos sobre esta temática de modo a obter conclusões mais sólidas. Contudo, os resultados apontam para a necessidade aumentar o conhecimento sobre rotulagem alimentar, bem como sobre a interpretação das informações nutricionais. Sugere-se o desenvolvimento de campanhas de educação alimentar, para aumentar os conhecimentos dos estudantes sobre rotulagem alimentar, de modo a fazerem escolhas mais conscientes e informadas.

## Declaração sobre as contribuições do autor

LO, CM, MR, DP, e CSR, conceção e desenho do estudo; CM, MR, DP, CSR, recolha de dados; LO, análise de dados; LO, redação, edição; LO e CR revisão; LO, tabelas; LO e CR, supervisão e redação final.

## Financiamento

Não aplicável.

## 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. Gomes, S., Nogueira, M., Ferreira, M., Gregorio, M. J., Graça, P., Jewell, J., & Breda, J. (2020). Consumer Attitudes Toward Food and Nutritional Labeling: Implications for Policymakers and Practitioners on a National Level. *Journal of Food Products Marketing*, 26(7), 470-485. <https://doi.org/10.1080/10454446.2020.1802381>
2. Viscecchia, R., Nocella, G., De Devitiis, B., Bimbo, F., Carlucci, D., Seccia, A., & Nardone, G. (2019). Consumers' Trade-Off between Nutrition and Health Claims under Regulation 1924/2006: Insights from a Choice Experiment Analysis. *Nutrients*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/nu11122881>
3. Anastasiou, K., Miller, M., & Dickinson, K. (2019). The relationship between food label use and dietary intake in adults: A systematic review. *Appetite*, 138, 280-291. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.03.025>
4. Wei, H., Jiang, K., Liu, B., Hu, Z., Zhao, Y., Xu, H., Sharma, M., & Pu, C. (2022). Understanding and Use of Nutrition Labels of Prepackaged Food by University Students: A Cross-Sectional Study in Chongqing, China. *Nutrients*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/nu14194189>
5. Silva, B., Lima, J. P. M., Baltazar, A. L., Pinto, E., & Fialho, S. (2022). Perception of Portuguese Consumers Regarding Food Labeling. *Nutrients*, 14(14). <https://doi.org/10.3390/nu14142944>
6. Shangguan, S., Afshin, A., Shulkin, M., Ma, W., Marsden, D., Smith, J., Saheb-Kashaf, M., Shi, P., Micha, R., Imamura, F., Mozaffarian, D., & Food PRICE (Policy Review and Intervention Cost-Effectiveness) Project (2019). A Meta-Analysis of Food Labeling Effects on Consumer Diet Behaviors and Industry Practices. *American journal of preventive medicine*, 56(2), 300-314. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.09.024>
7. Buyuktuncer, Z., Ayaz, A., Dedebayraktar, D., Inan-Eroglu, E., Ellahi, B., & Besler, H. T. (2018). Promoting a Healthy Diet in Young Adults: The Role of Nutrition Labelling. *Nutrients*, 10(10), 1335. <https://doi.org/10.3390/nu10101335>
8. Vadeboncoeur, C., Townsend, N., & Foster, C. (2015). A meta-analysis of weight gain in first year university students: is freshman 15 a myth?. *BMC obesity*, 2, 22. <https://doi.org/10.1186/s40608-015-0051-7>
9. Morais, A. C. B., Stangarlin-Fiori, L., Bertin, R. L., & Medeiros, C. O. (2020). Conhecimento e uso de rótulos nutricionais por consumidores. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 15:e45847 <https://doi.org/10.12957/demetra.2020.45847>.
10. Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho. (2006). *Jornal Oficial da União Europeia L 404* de 30 de Dezembro de 2006.

## Relationship between weight status with sleep health, physical activity and perception of food consumption under stress among firefighters: a pilot study

.....

## Relação entre o estado ponderal com a saúde do sono, atividade física e percepção do consumo sob stress entre os bombeiros: um estudo piloto

Leandro Oliveira <sup>1</sup>  , Carolina Oliveira <sup>2</sup>, Madalena Martins<sup>2</sup>, Madalena Silva <sup>2</sup>, Sofia Martins <sup>2</sup>,  
and Carina Rossoni <sup>2,3</sup> 

**Keywords:** weight status, sleep health, physical activity, consumption, firefighters

**Palavras-chave:** estado ponderal, sono, atividade física, consumo, bombeiros

### To Cite:

Oliveira, L., Oliveria, C., Martins, M., Silva, M., Martins, S., Rossoni, C. (2023) Relationship between weight status with sleep health, physical activity and perception of food consumption under stress among firefighters: a pilot study. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 37-50.

 [10.19277/bbr.20.1.308](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.308)

1 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

2 - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

3 - Universidade de Lisboa – Instituto de Saúde Ambiental da Faculdade de Medicina, Avenida Professor Egas Moniz, 1649-028 Lisboa - Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[leandro.oliveira@ulusofona.pt](mailto:leandro.oliveira@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 12/04/2023  
Accepted / Aceite: 07/06/2023

### Abstract

Firefighters are a population group that is subject to stress and poorer sleep quality due to their professional activity. The aim of this cross-sectional pilot study was to explore the relationship between weight status and sleep health, physical activity, perception of dietary consumption, and stress among firefighters. The study was conducted in May 2022. An online questionnaire was developed using Google Forms® and shared through social media for data collection. A total of 30 firefighters participated in the study, with the majority being male (60.0%), over 40 years of age (56.7%), and residing in Lisbon (90.0%). The majority of participants were overweight (63.3%), walked for 4 days per week for about 30 minutes, and spent approximately 4 hours in sedentary activities. The median score for sleep health was 18 out of 30 points. Weight status was only positively correlated with age. These results suggest a possible need for the development of health programs targeting firefighters to improve their lifestyles and occupational health, with further studies needed with a larger sample size.

### Resumo

Os bombeiros são um grupo populacional que está sujeito a stress e pior qualidade do sono decorrentes da sua atividade profissional. Este trabalho teve como objetivo estudar a relação entre o estado ponderal com a saúde do sono, atividade física, percepção do consumo alimentar ou dietético e o stress entre os bombeiros. Este estudo piloto transversal decorreu durante o mês de maio de 2022. Para recolha de dados foi desenvolvido um questionário online de aplicação direta GoogleForms® e partilhado através das redes sociais. Participaram neste estudo 30 bombeiros sendo a maioria do sexo masculino (60,0%), com mais de 40 anos (56,7%), com residência em Lisboa (90,0%). A maioria dos participantes tinha excesso de peso (63,3%), caminhavam 4 dias por semana cerca de 30 minutos, e passavam cerca de 4 horas em atividades sedentárias. A mediana da pontuação da saúde do sono foi 18 em 30 pontos. O estado ponderal apenas estava correlacionado de forma positiva com a idade. Estes resultados apontam para uma possível necessidade do desenvolvimento de programas de saúde dirigidos aos bombeiros de modo a melhorarem os seus estilos de vida e saúde ocupacional, sendo necessária a realização de mais estudos com uma amostra de maior dimensão.



## Introduction

Firefighters are exposed to several activities that pose significant short-term, medium-term, and long-term health risks. Among these risks inherent to the firefighter activity, we can highlight the development of cardiovascular diseases, respiratory diseases, musculoskeletal diseases, and cancer. Equally important is the higher likelihood of work-related accidents compared to the general population (1).

In Portugal, the latest data from the National Institute of Statistics shows that in 2021, there were 26,123 firefighters, of which 21,137 (80.9%) were male and 10,392 (60.2%) were volunteers (2). According to Decree-Law 247/2007, of June 27th, to professional firefighting bodies, among other activities, it is their responsibility to perform the following functions: firefighting; providing assistance to the population in case of fires, floods, collapses, and collisions, as well as in all accidents, disasters, or calamities; providing assistance to shipwrecked individuals; and performing first aid and health-related activities in the field of healthcare (3).

In order to perform their duties, firefighters must maintain good health and proper nutritional status. Firefighters with a high body mass index (BMI), body fat percentage (%), or waist circumference are at increased risk of injuries during service, (4), more days with reduced health (5) as well as a higher mortality rate while performing their duties due to cardiovascular diseases (6). In fact, many firefighters experience a significant weight gain due to an increase in body fat throughout their careers. (7). For example, a study that followed firefighters from Massachusetts between 1996 and 2001 found an increase in body mass index (BMI) from 29 kg/m<sup>2</sup> to 30 kg/m<sup>2</sup>, with the prevalence of obesity increasing from 35% to 40% during that period (7). Another study reported that obese firefighters had a higher prevalence of hypertension, higher levels of total cholesterol, and lower levels of high-density lipoprotein concentration compared to non-obese firefighters (both volunteer and career) (8).

## Introdução

Os bombeiros são expostos a vários riscos que acarretam elevados riscos de saúde a curto, médio e longo prazo. De entre estes riscos inerentes à atividade de bombeiro podemos destacar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, doenças músculo-esqueléticas, e cancro. Não menos importante é a maior probabilidade de ocorrência de acidentes de trabalho quando comparados com a população em geral (1).

Em Portugal, os dados mais recentes do Instituto Nacional de Estatística mostram que, em 2021, existiam 26 123 bombeiros, sendo 21 137 (80,9 %) do sexo masculino, e 10 392 (60,2 %) voluntários (2). Segundo o Decreto-lei 247/2007, de 27 de Junho, aos corpos de bombeiros profissionais compete, no exercício das suas funções, as seguintes atividades (entre outras): o combate a incêndios; prestar socorro às populações em caso de incêndios, inundações, desabamentos e abaloamentos, e em todos os acidentes, catástrofes ou calamidades; prestar socorro a náufragos; e exercer atividades de socorrismo na área da saúde (3).

Para o desempenho das suas funções, os bombeiros devem ter um bom estado de saúde, bem como um estado nutricional adequado. Bombeiros com um índice de massa corporal (IMC) elevado, percentagem de gordura corporal (%) ou perímetro da cintura elevado, possuem uma maior probabilidade de lesões no serviço, (4), mais dias com menos saúde (5), e taxa de mortalidade mais elevada no desempenho das suas funções devido a doenças cardiovasculares (6). De facto, muitos bombeiros sofrem um aumento de peso muito à custa de um aumento da quantidade de gordura corporal ao longo da sua carreira (7). Por exemplo, um estudo, que seguiu bombeiros de Massachusetts entre 1996 e 2001, constatou um aumento do índice de massa corporal (IMC) de 29 kg/m<sup>2</sup> para 30 kg/m<sup>2</sup>, tendo a prevalência de obesidade aumentado de 35% para 40% durante esse período (7). Outro estudo, reportou que bombeiros obesos tinham uma maior prevalência de hipertensão, níveis mais altos de colesterol total, níveis menores da concentração de lipoproteína de alta densidade em comparação com bombeiros (voluntários e de carreira) não obesos (8).

In addition, the fact that firefighters deal directly with people's lives requires them to be focused and alert for quick decision-making, which can have life or death consequences for the individuals they rescue (9). These situations can lead to post-traumatic stress disorder (PTSD) and chronic occupational stress (10). It is known that occupational stress affects not only employees but also organizations due to its implications: psychological (anxiety, depression, irritability, impaired decision-making, lack of concentration); physical (headaches, hypertension, cardiovascular, pulmonary, renal, musculoskeletal, and immune system disorders); and organizational (absenteeism, turnover, low productivity, job dissatisfaction, reduced performance) (9).

These consequences caused by occupational stress also have implications on firefighters' weight management. In a study of metropolitan Australian firefighters, food intake was largely determined by shift schedules, attitudes of colleagues, time, accessibility, and health considerations (11).

Several studies have pointed out a bidirectional relationship between dietary habits and sleep quality. Poor sleep quality can negatively affect dietary habits, resulting in low-nutrient quality food intake and increased appetite and energy intake (12). On the other hand, dietary choices can also influence sleep quality (13).

The aim of this study is to study the relationships between weight status, sleep health, physical activity, and perceived stress-related eating in a sample of Portuguese firefighters. Understanding these interactions can allow the development of tailored health-promoting interventions for this population. To date, no studies have been found in Portugal that outline and relate these lifestyle variables comprehensively in firefighters, making this research relevant to contribute to knowledge about the health and well-being of this specific population.

Além disso, o facto de os bombeiros lidarem diretamente com a vida das pessoas, exige que estes estejam concentrados e conscientes, para uma rápida tomada de decisão, que poderá ter como consequência a vida ou a morte dos indivíduos que socorrem (9). Estas situações podem levar a stress pós-traumático e stress ocupacional crónico (10). Sabe-se que o stress ocupacional afeta não só os colaboradores, mas também as organizações devido às suas implicações: psicológicas (ansiedade; depressão; irritabilidade; incapacidade de tomar decisões; falta de concentração); físicas (dores de cabeça; hipertensão; doenças cardiovasculares, pulmonares e renais; problemas musculoesqueléticos, e do sistema imunitário); e organizacionais (falta ao trabalho; rotatividade; baixa produtividade; insatisfação com o trabalho; baixo empenho) (9).

Estas consequências causadas por este stress ocupacional têm também implicações na gestão do peso dos bombeiros. Em um estudo com bombeiros australianos metropolitanos, a ingestão de alimentos foi amplamente determinada pelos horários dos turnos, atitudes dos colegas de trabalho, tempo, acessibilidade e saúde (11).

Vários estudos têm apontado para uma relação bidirecional entre os hábitos alimentares e a qualidade do sono, nomeadamente uma má qualidade do sono pode afetar negativamente os hábitos alimentares, traduzindo-se numa alimentação de baixa qualidade nutricional, e num aumento do apetite, e ingestão energética (12), por outro lado, as escolhas alimentares podem influenciar a qualidade do sono (13).

O objetivo deste trabalho é estudar a relação entre o estado ponderal com a saúde do sono, atividade física e perceção do consumo alimentar e o stress numa coorte de bombeiros portugueses. O conhecimento destas interações pode permitir o delineamento de intervenções promotoras de saúde feitas à medida deste grupo populacional. Em Portugal não foram encontrados estudos que relacionassem estas variáveis nem que fornecessem uma visão tão completa dos estilos de vida dos bombeiros portugueses, portanto esta investigação é relevante para contribuir para o conhecimento sobre a saúde e o bem-estar desta população específica.

## Materials and Methods

### *Study Design and Data Collection*

This is a pilot cross-sectional study that included firefighters in Portugal who were 18 years of age or older, and excluded those who had been firefighters for less than 6 months.

Data collection was conducted using an online questionnaire, through the GoogleForms® platform, and all data were self-reported. The data collection questionnaire included the following sections: sociodemographic characteristics (gender, age, education level, marital status, anthropometric data); sleep quality; food consumption under stress; and physical activity.

The questionnaire was available during the month of May 2022 and was shared through Facebook® directly to firefighters, requesting their participation in the study as well as asking them to share it with their colleagues in the profession. Thus, a non-probabilistic snowball sampling method was used. Body mass index (BMI) was calculated using the formula  $\text{weight (kg)} / \text{height}^2 \text{ (m)}$  (14), and classified according to the World Health Organization criteria for adults (15).

Sleep health was assessed using the Satisfaction Alertness Timing Efficiency Duration (SATED) scale, validated for the Portuguese population (16). The scale assesses five core dimensions of sleep that have been consistently associated with various health outcomes, including sleep regularity, subjective satisfaction with sleep, alertness during waking hours, timing, efficiency, and sleep duration. In the original scale, each question is assigned a value of 0, 1, or 2 points, and the final score is calculated by summing the individual item scores, resulting in a total score that can range from 0 (poor sleep health) to 10 (good sleep health) (17). However, as mentioned by Buysse (17), other response options can be given using Likert scales. In this study, we chose to use the version validated in a sample of the Portuguese population (16), where a 6-point Likert scale was used (0 - never; 5 - always), resulting in a maximum final score of 30 points. The higher the score, the better the sleep health.

## Material e Métodos

### *Desenho do estudo e recolha de dados*

Este é um estudo piloto transversal que teve como critérios de inclusão ser bombeiro em Portugal e ter 18 anos ou mais, e como critérios de exclusão ser bombeiro há < menos de 6 meses.

Utilizou-se um questionário online para a recolha de dados, este foi contruído através da plataforma GoogleForms® e todos os dados foram autorreportados. O questionário para recolha de dados compreendia as seguintes secções: caracterização sociodemográfica (sexo, idade, escolaridade, estado civil, dados antropométricos); qualidade do sono; consumo alimentar sob stress; e atividade física.

O questionário esteve disponível durante o mês de maio de 2022 e foi partilhado através do Facebook® diretamente a bombeiros, solicitando a sua participação no estudo, bem como a partilha do mesmo pelos seus colegas de profissão. Deste modo, foi realizada uma amostragem não probabilística do tipo bola de neve. Foi calculado o índice de massa corporal (IMC) através da fórmula  $\text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$  (14), e classificado de acordo com os critérios da organização mundial de saúde para adultos (15).

A saúde do sono foi avaliada através da escala *Satisfaction Alertness Timing Efficiency Duration* (SATED) validada para a população portuguesa (16). A escala avalia cinco dimensões centrais do sono, que têm sido consistentemente associadas com os vários resultados ao nível da saúde, nomeadamente a regularidade do sono; satisfação subjetiva com o sono; estado de alerta durante as horas de vigília; timing; eficiência; e duração do sono. Na escala original, a cada questão é atribuído o valor 0, 1 ou 2 pontos, sendo a pontuação final dada pela soma individual dos itens, obtendo-se um resultado total que pode variar entre 0 (saúde do sono pobre) e 10 (boa saúde do sono) (17). Porém, tal como mencionado por Buysse (17), podem ser dadas outras opções de resposta utilizando escalas de *Likert*. Neste estudo optou-se por usar a versão validada numa amostra da população portuguesa (16), em que foi utilizada uma escala do tipo *Likert* de 6 pontos (0 – nunca; 5 – sempre), resultando numa pontuação final de, no máximo, 30 pontos. Quanto maior a pontuação maior a saúde do sono.

To assess the participants' perception of food consumption, smoking habits, and physical exercise under conditions of stress, they were asked to report their level of agreement (on a Likert-type scale ranging from 1 - strongly disagree to 5 - strongly agree) with the following statements: "When I feel stressed, I tend to consume more sweets"; "When I feel stressed, I tend to engage in more physical exercise"; "When I feel stressed, I tend to consume more fast food"; "When I feel stressed, I tend to smoke"; "When I feel stressed, I tend to eat more"; and "When I feel stressed, I tend to consume fewer fruits and vegetables."

Physical activity was assessed using the Portuguese version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) proposed by the World Health Organization, which provides information on the time spent walking, engaging in moderate and vigorous-intensity activities, and sedentary behavior over the past seven days (18). An open-ended question was also included to inquire about the reasons that hindered participation in physical exercise.

#### *Ethical considerations*

This study was conducted in accordance with the ethical guidelines established in the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent amendments, or comparable ethical standards (19). Information about the study was provided to all volunteers, and informed consent was obtained, explaining in detail the study's objectives and protocol. Confidentiality and exclusive use of the collected data for the present study were assured, and the data were treated in a way that ensured anonymity.

#### *Statistical analysis*

The IBM SPSS Statistics software, version 26 for Windows, was used for the statistical analysis of this study. Descriptive statistics included calculating medians and percentiles (P25; P75), as well as absolute frequencies (n) and relative frequencies (%). Fisher's exact test was used to assess the independence between pairs of variables, while the Mann-Whitney test was used to compare mean ranks between independent samples. Spearman's correlation coefficient (r) was applied to evaluate the degree of association between pairs of continuous variables. The null hypothesis was rejected for a p-value < 0.05.

Para avaliação da percepção sobre o consumo alimentar, hábitos tabágicos e exercício físico sob condições de stress foi pedido aos participantes que reportassem (numa escala do tipo *Likert* de 1 – discordo muito a 5 – concordo muito) o grau de concordância às seguintes questões: quando me sinto stressado tenho tendência para consumir mais doces; quando me sinto stressado tenho tendência para praticar mais exercício físico; quando me sinto stressado tenho tendência para consumir mais fast-food; quando me sinto stressado tenho tendência para fumar; quando me sinto stressado tenho tendência para comer mais; e, quando me sinto stressado tenho tendência para consumir menos frutas e hortícolas.

A atividade física foi avaliada pela versão portuguesa do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) proposto pela Organização Mundial de Saúde, este fornece informações dos últimos sete dias sobre o tempo despendido a andar, em atividades de intensidade vigorosa e moderada e em atividade sedentária (18). Foi também incluída uma questão de resposta aberta sobre quais os motivos que dificultavam a prática de exercício físico.

#### *Considerações éticas*

Este estudo foi realizado seguindo as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsínquia de 1964 e as suas posteriores emendas ou normas éticas comparáveis (19). Foram disponibilizadas informações a todos os voluntários sobre o estudo e um consentimento informado onde se explicou detalhadamente o objetivo e protocolo do estudo, foi-lhes garantida a confidencialidade e o uso exclusivo dos dados recolhidos para o presente estudo, sendo os dados tratados de forma a garantir o seu anonimato.

#### *Análise estatística*

Foi utilizado o software IBM SPSS Statistics, versão 26 para Windows para o tratamento estatístico deste estudo. A estatística descritiva compreendeu o cálculo de medianas e percentis (P25; P75), bem como de frequências absolutas (n) e relativas (%). De modo a avaliar a independência entre pares de variáveis foi utilizado o teste exato de Fisher, já para comparar ordens médias entre amostras independentes foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Por seu turno, o coeficiente de correlação de Spearman (r) foi aplicado para avaliação do grau de associação entre pares de variáveis contínuas. Rejeitou-se a hipótese nula para um  $p < 0,05$ .

## Results and Discussion

This study employed a pilot approach to investigate the relationship between body weight status, sleep health, physical activity, and perceived stress-related consumption in a sample of active Portuguese firefighters. The main findings of our study were: a high prevalence of overweight/obesity, low physical activity, poor sleep quality, and increased consumption of sweets associated with stress.

In Table 1, the sociodemographic characterization, weight status, and physical activity of the study participants are presented. Our sample consisted of 30 firefighters, with the majority being male (60.0%), over 40 years of age (56.7%), married (60.0%), residing in the Lisbon metropolitan area (90.0%), having completed secondary education (53.3%), and having another profession in addition to being firefighters (53.3%).

Regarding weight status, the majority were classified as overweight - pre-obesity and obesity (63.3%). The high prevalence of overweight/obesity found in this study is consistent with that found in the Portuguese population (20), as well as a study conducted on Portuguese firefighters (21) which reported a prevalence of overweight of 62%. Furthermore, our results are also in line with other international studies in firefighters, such as those conducted in the United States (22), Brazil (23), and France (24), which report a high prevalence of overweight/obesity among firefighters.

Regarding physical activity, it was found that the participants engaged in walking four times a week for 35 minutes and engaged in vigorous activities one day a week for 60 minutes. In addition, they engaged in sedentary activities for 120 minutes daily. When asked about the reasons that hindered physical activity, the majority of firefighters reported work-related issues (excessive working hours, rotating shifts, among others) (36.7%), lack of time (36.7%), and dislike of physical activity or laziness (27.6%). Similar results to those reported in our study have been found in other studies with firefighters (22,25), and are also consistent with findings in the Portuguese population (26), where 73% of Portuguese individuals report never engaging in exercise or sports, with an

## Resultados e discussão

Este estudo consistiu uma abordagem piloto para o estudo da relação entre o estado ponderal, a saúde do sono, atividade física, e a percepção do consumo alimentar sob stress numa amostra de bombeiros portugueses no ativo. Os principais resultados do nosso estudo foram: elevada prevalência de excesso de peso, uma baixa atividade física, uma baixa qualidade do sono, e uma maior ingestão de doces associada ao stress.

Na Tabela 1 é apresentada a caracterização sociodemográfica, estado ponderal e atividade física dos participantes no estudo. A nossa amostra foi constituída por 30 bombeiros, sendo a maioria do sexo masculino (60,0%), com mais de 40 anos (56,7%), casados (60,0%), com residência na área metropolitana de Lisboa (90,0%), tinham o ensino secundário concluído (53,3%) e além de serem bombeiros apresentavam outra atividade profissional (53,3%).

Em relação ao estado ponderal, a maioria foi classificada como tendo excesso de peso — pré-obesidade e obesidade (63,3%). A elevada prevalência de excesso de peso encontrada neste estudo vai ao encontro da encontrada na população portuguesa (20), bem como ao de um estudo realizado em bombeiros portugueses (21) que dava conta de um prevalência de excesso de peso de 62%. Além disso, os nossos resultados também são concordantes com outros estudos internacionais em bombeiros, por exemplo nos Estados Unidos da América — EUA (22), Brasil (23) e França (24) que reportam uma elevada prevalência de excesso de peso entre bombeiros.

No que concerne à atividade física, verificou-se que os participantes faziam caminhadas quatro vezes por semana com uma duração de 35 minutos e realizavam atividades vigorosas um dia por semana durante 60 minutos. Além disso, diariamente realizavam atividades sedentárias (por exemplo, estar sentado ao computador, atendimento telefónico, entre outras) durante 120 minutos. Quando questionados sobre os motivos que dificultavam a prática de atividade física, a maioria dos bombeiros respondeu assuntos relacionados com atividades laborais (excesso de horas de trabalho, turnos rotativos, entre outros) (36,7%), falta de tempo (36,7%), não gostar de realizar atividade física ou preguiça (27,6%). Resultados semelhantes aos reportados no nosso estudo foram encontrados noutros trabalhos com bombeiros (22,25), indo também ao encontro do reportado na população portuguesa (26), onde 73% dos portugueses dizem nunca se exercitar ou praticar

**Table 1 - Sociodemographic characterization, weight status and physical activity.**

**Tabela 1 - Caracterização sociodemográfica, estado ponderal e atividade física.**

n=30	n (%)
<b>Sex / Sexo</b>	
Male / Masculino	18 (60.0)
Female / Feminino	12 (40.0)
<b>Age / Idade</b>	
From 18 to 40 years old / Dos 18 aos 40 anos	13 (43.3)
More than 40 years / Mais de 40 anos	17 (56.7)
<b>Marital status / Estado civil</b>	
Married / Casado	18 (60.0)
Divorced / Divorciado/a	3 (10.0)
Single / Solteiro (a)	8 (26.7)
Widowed / Viúvo (a)	1 (3.3)
<b>Region of Residence / Região de Residência</b>	
Center / Centro	1 (3.3)
Lisboa Region / AM Lisboa	27 (90.0)
Alentejo / Alentejo	2 (6.7)
<b>Education / Habilitações literárias</b>	
Ensino Basic - 2° cycle / Ensino Básico - 2ºCiclo	3 (10.0)
Ensino Basic - 3° cycle / Ensino Básico - 3º Ciclo	3 (10.0)
High School / Ensino Secundário	16 (53.3)
Bachelor's degree / Licenciatura	8 (26.7)
<b>Do you have another profession? / Tem outra profissão ?</b>	
Yes / Sim	16 (53.3)
No / Não	14 (46.7)
<b>Weight Status / Estado Ponderal</b>	
Low weight / Baixo peso	1 (3.3)
Normal weight / Normoponderal	10 (33.3)
Pré-obesity / Pré-obesidade	12 (40.0)
Obesity / Obesidade	7 (23.3)
<b>Physical activity / Atividade Física</b>	
	<b>Median (Percentile 25; Percentile 75)</b>
Walking (days) / Caminhada (dias) - n=30	4 (1.0; 7.0)
Walking (minutes/day)/ Caminhada (minutos/dia) - n=28	35 (5.0; 60.0)
Sedentary (minutes/day) / Tempo sentado (minutos/dia) n=28	270 (120.0; 570.0)
Vigorous (days) / Vigorosa (dias) - n=30	1 (0.0; 3.0)
Vigorous (minutes/day) / Vigorosas (minutos/dia) - n=30	60 (0.0; 120.0)
Moderate (days) / Moderada (dias) - n=30	0 (0.0; 3.0)
Moderate (minutes/day) / Moderada (minutos/dia) - n=30	30 (0.0; 60.0)

additional 5% doing so only "rarely". In the case of Portuguese firefighters, it has also been reported that 49% do not engage in any physical activity (21).

These results deviate from the recommendations of the World Health Organization, which states that adults should engage in at least 150 to 300 minutes of moderate-intensity aerobic physical activity, or at least 75 to 150 minutes of vigorous-intensity aerobic physical activity, or an equivalent combination of moderate and vigorous-intensity physical activity throughout the week for substantial health benefits (27). In our study, low physical activity was observed among firefighters, including engaging in walks four days per week for approximately 35 minutes, and engaging in sedentary activities for about 270 minutes per day.

Physical activity in firefighters has been studied and identified as an important determinant of health (28,29). A study with firefighters from Cyprus (30) showed that physical activity is inversely associated with occupational stress and serves as an important mitigating factor for occupational stress in firefighters. According to a study with South Korean firefighters (31), a high perception of excessive workload, higher engagement in physically demanding tasks, higher frequency of occupational activities, and engagement in high-intensity physical activity were significantly correlated with an increased risk of insomnia.

Table 2 presents the assessment of sleep health according to the SATED scale. The majority of participants adopt an intermediate position on the SATED scale for most of its items. However, about 40% of participants mentioned "always" for the items "Can you stay awake all day without taking a nap?" and "Do you find yourself already asleep (or in bed) between two and four in the morning?". The median (25th percentile; 75th percentile) score on the SATED scale was 18 (8.0; 23.0), with a maximum score of 30 points. Indeed, the literature reports poor sleep quality among firefighters (32,33), which is consistent with our study and even more prevalent among firefighters who work night shifts (34). Poor sleep quality can affect cognitive functioning (e.g., processing speed, visomotor coordination, and reaction time), increasing the likelihood of poor job performance or injury (35).

desporto, com mais 5% a fazê-lo apenas "raramente". No caso dos bombeiros portugueses, também é relatado que 49% não pratica nenhuma atividade física (21).

Estes resultados afastam-se do recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Segundo esta, os adultos devem realizar pelo menos 150 a 300 minutos de atividade física aeróbica de intensidade moderada ou pelo menos 75 a 150 minutos de atividade física aeróbica de intensidade vigorosa; ou uma combinação equivalente de atividade física de intensidade moderada e vigorosa ao longo da semana para benefícios substanciais à saúde (27). No nosso estudo verificou-se uma baixa atividade física entre os bombeiros, nomeadamente a realização de caminhadas quatro dias por semana durante cerca de 35 minutos, e de atividades sedentárias cerca de 270 minutos por dia.

A atividade física em bombeiros tem sido um fator estudado, e apontado como um importante determinante de saúde (28,29). Um estudo (30) com bombeiros do Chipre, a atividade física parece estar inversamente associada ao stresse ocupacional e serve como um importante fator atenuante do stresse ocupacional em bombeiros. Segundo um estudo com bombeiros sul coreanos (31) uma elevada percepção de excesso de trabalho, maior realização de atividades que exigem maior força física, uma maior frequência de realização de atividades ocupacionais, e realização de atividade física de alta intensidade foram significativamente correlacionados com um risco aumentado de insónia.

Na Tabela 2 é apresentada a avaliação da saúde do sono de acordo com a escala SATED. A maioria dos participantes adota uma posição intermedia da escala SATED para a maioria dos seus itens. Contudo, cerca de 40% dos participantes menciona "sempre" aos itens "Consegue ficar acordado todo o dia sem fazer uma sesta?" e "Encontra-se já a dormir (ou na cama) entre as duas e as quatro horas da madrugada?". A mediana (percentil 25; percentil 75) da pontuação da escala SATED foi 18 (8,0; 23,0), num máximo de 30 pontos. De facto, a literatura reporta uma baixa qualidade do sono entre os bombeiros (32,33), o que também encontramos no nosso estudo e ainda mais incidente nos bombeiros que fazem turnos da noite (34). Um sono de má qualidade pode afetar o funcionamento cognitivo (por exemplo, velocidade de processamento, coordenação visomotora e tempo de reação), aumentando a probabilidade de um mau desempenho no trabalho ou lesão (35).

**Table 2 -** Sleep health assessment according to the SATED scale.

**Tabela 2 -** Avaliação da saúde do sono de acordo com a escala SATED.

Sleep health / Saúde do sono (n=30)						
n (%)	Never / Nunca	Rarely / Raramente	Occasionally / Ocasionalmente	Frequently/ Frequentemente	Very frequently / Muito frequentemente	Always / Sempre
Do you go to bed and get up at about the same time every day? / Deita-se e levanta-se mais ou menos à mesma hora todos os dias?	4 (13.3)	2 (6.7)	8 (26.7)	5 (16.7)	5 (16.7)	6 (20.0)
Are you satisfied with your sleep? / Está satisfeito(a) com o seu sono?	8 (26.7)	3 (10.0)	5 (16.7)	2 (6.7)	8 (26.7)	4 (13.3)
Can you stay awake all day without taking a nap? / Conseguir ficar acordado(a) todo o dia sem fazer uma sesta?	0 (0.0)	3 (10.0)	6 (20.0)	4 (13.3)	4 (13.3)	4 (13.3)
Are you already sleeping (or in bed) between two and four in the morning? / Encontra-se já a dormir (ou na cama) entre as duas e as quatro horas da madrugada?	5 (16.7)	3 (10.0)	3 (10.0)	3 (10.0)	4 (13.3)	12 (40.0)
Spend less than 30 minutes awake at night? / Passa menos de 30 minutos acordado à noite?	4 (13.3)	5 (16.7)	7 (23.3)	4 (13.3)	4 (13.3)	6 (20.0)
Do you sleep between 7 and 9 hours a day? / Dorme entre 7 e 9 horas por dia?	7 (23.3)	4 (13.3)	4 (13.3)	6 (20.0)	6 (20.0)	3 (10.0)
	<b>Median (Percentil 25; Percentil 75)</b>					
<b>SATED score / Pontuação SATED*</b>	18 (8.0; 23.0)					

Finally, in Table 3, the perception of consumption and practice of physical exercise under stress conditions is assessed. Approximately 50% of participants strongly disagree/disagree that they tend to engage in more physical exercise and consume more fast food when they feel stressed. Participants also mentioned strongly disagreeing/disagreeing that when they feel stressed, they tend to smoke (63.3%), eat more (46.6%), and consume fewer fruits and vegetables (40.0%). On the other hand, they mentioned agreeing/agreeing strongly that when they feel stressed, they tend to consume more sweets (43.4%). Correlation tests were also conducted between variables (age, BMI, SATED scale, and perception of consumption under stress conditions). It was found that higher age is positively correlated with higher BMI ( $r: 0.290$ ;  $p: 0.041$ ) and negatively correlated with the tendency to consume fast food ( $r: -0.427$ ;  $p: 0.002$ ) and eat more ( $r: -0.361$ ;  $p: 0.010$ ) when feeling stressed. Higher scores on the SATED scale are negatively correlated with the

Por fim, na Tabela 3 é avaliada a percepção do consumo e prática de exercício físico em condições de stress. Cerca de 50% dos participantes discorda muito/ discorda que quando se sentem stressados têm tendência para praticar mais exercício físico, e consumir mais fast food. Os participantes mencionam ainda discordar muito/ discordar que quando se sentem stressados têm tendência para fumar (63,3%), para comer mais (46,6%), e consumir menos frutas e hortícolas (40,0%). Por outro lado, mencionam concordar/ concordar muito que quando se sentem stressados têm tendência para consumir mais doces (43,4%). Foram ainda realizados testes de correlação entre variáveis (idade, IMC, escala SATED e percepção de consumo sob condições de stress). Deste modo, verificou-se que quanto maior a idade, maior o IMC ( $r: 0,290$ ;  $p: 0,041$ ) e menor a tendência de consumo de fast food ( $r: -0,427$ ;  $p: 0,002$ ), e comer mais ( $r: -0,361$ ;  $p: 0,010$ ) quando se sentem stressados. Quanto maior a pontuação na escala SATED, menor a tendência



**Table 3** - Perception of consumption and practice of physical exercise under stress conditions.  
**Tabela 3** - Percepção do consumo e prática de exercício físico em condições de stress (n=30).

When I feel stressed I tend to... / Quando me sinto stressado tenho tendência para...	I strongly disagree / Discordo muito	I disagree / Discordo	I do not agree nor disagree / Não concordo nem discordo	I agree / Concordo	I strongly agree / Concordo muito
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
...eat more sweets. / ...consumir mais doces.	8 (26.7)	5 (16.7)	4 (13.3)	8 (26.7)	5 (16.7)
...exercise more. / ... praticar mais exercício físico.	12 (40.0)	4 (13.3)	7 (23.3)	6 (20.0)	1 (3.3)
...eat more fast food./ ...consumir mais fast-food.	11 (36.7)	7 (23.3)	6 (20.0)	4 (13.3)	2 (6.7)
...smoke. / ...fumar.	19 (63.3)	0 (0.0)	2 (6.7)	5 (16.7)	4 (13.3)
...eat more. / ... comer mais	7 (23.3)	7 (23.3)	5 (16.7)	4 (13.3)	7 (23.3)
...consume less fruits and vegetables. / ...consumir menos frutas e hortícolas	2 (6.7)	10 (33.3)	7 (23.3)	6 (20.0)	5 (16.6)

tendency to smoke when feeling stressed ( $r: -0.333$ ;  $p: 0.018$ ). Higher tendency to consume more sweets is positively correlated with the tendency to eat more ( $r: 0.783$ ;  $p: <0.001$ ), consume more fast food ( $r: 0.589$ ;  $p: <0.001$ ), and consume fewer fruits and vegetables ( $r: 0.516$ ;  $p: <0.001$ ) when feeling stressed. Higher tendency to smoke is positively correlated with the tendency to consume fewer fruits and vegetables ( $r: 0.342$ ;  $p: 0.015$ ) when feeling stressed. Higher tendency to eat more is positively correlated with the tendency to consume fewer fruits and vegetables ( $r: 0.466$ ;  $p: <0.001$ ) when feeling stressed.

Stress has also been associated with poor sleep quality (36) and increased consumption of calorie-dense foods, including fast food and sweets, and a reduction in healthy foods such as fruits and vegetables. In fact, according to a study, individuals under stress tend to consume foods that they normally avoid due to weight loss or health concerns (i.e., high-energy, high-fat snacks), reporting that consuming these foods makes them feel better (37). Another study found that individuals with higher stress levels tend to consume more sweets and fast food (38). This may provide a possible explanation for the correlations found in our study, where it was observed that a higher tendency to consume sweets was associated with a higher tendency to eat more, consume more fast food, and eat fewer fruits and vegetables when feeling stressed. Considering that firefighting is a profession associated with high levels of stress (39), and our sample showed a tendency towards consumption of unhealthy foods (such as sweets, high in sugars and energy) and low physical activity, the high prevalence of overweight found in our study is justified.

para fumar ( $r: -0,333$ ;  $p: 0,018$ ) quando se sentem stressados. Quanto maior a tendência para consumir mais doces, maior a tendência para comer mais ( $r: 0,783$ ;  $p: <0,001$ ), consumir mais fast food ( $r: 0,589$ ;  $p: <0,001$ ), e consumir menos frutas e hortícolas ( $r: 0,516$ ;  $p: <0,001$ ) quando se sentem stressados. Quanto maior a tendência para fumar, maior a tendência para consumir menos frutas e hortícolas ( $r: 0,342$ ;  $p: 0,015$ ) quando se sentem stressados. Quanto maior a tendência para comer mais, maior a tendência para consumir menos frutas e hortícolas ( $r: 0,466$ ;  $p: <0,001$ ) quando se sentem stressados.

O stress também tem sido associado a uma baixa qualidade do sono (36) e aumento do consumo ou ingestão alimentar de alimentos calóricos, destaca-se fast food, doces e assim uma redução de alimentos saudáveis, como frutas e hortícolas. De facto, segundo um estudo indivíduos sob stress consomem alimentos que normalmente evitam por motivos de perda de peso ou de saúde (ou seja, snacks altamente energéticos e ricos em gordura), reportando que o consumo desses alimentos os fazem sentir melhor (37). Outro estudo relata que indivíduos com maior tensão tendem a consumir mais doces e fast foods (38). Isto pode ser uma possível explicação para as correlações encontradas no nosso estudo, em que se verificou que quanto maior tendência para consumir mais doces, maior a tendência para comer mais, consumir mais fast food e consumir menos frutas e hortícolas quando se sentem stressados. Tendo em conta que a atividade de bombeiro está sujeita a elevados níveis de stress (39), e tendo a nossa amostra tendência para o consumo de alimentos pouco saudáveis (como os doces, ricos em açúcares e energia), e baixa atividade física, é justificável a elevada prevalência de excesso de peso encontrada.

In order to perform their duties effectively, firefighters must maintain good health (1). However, in terms of occupational health for firefighters, only the "Health+" program was found, which aims to address physical activity, nutrition, and stress management. Additionally, a manual developed by the Directorate-General of Health and the National Authority for Civil Protection was also founded (1) to raise awareness among firefighters and fire departments about the importance of adopting a healthy lifestyle, no intervention programs specifically targeted at this population were found. Therefore, the results of this study highlight the need for the development and, above all, the implementation of health promotion programs tailored to this population.

#### *Limitations and Future Directions*

As any study, our work has some limitations. Firstly, its cross-sectional design does not allow for extrapolation of results. The small sample size (only 30 participants) is another limitation, although efforts were made to increase the sample size by sharing the questionnaire at different times on social media. Additionally, the self-reported nature of the anthropometric data is a limitation, and results should be interpreted with caution. For example, a study conducted in firefighters (men and women) in the USA (40) found that women tended to underestimate weight more than men, and men tended to overestimate height more than women. Furthermore, the use of snowball sampling for participant recruitment did not allow for control over sample composition or representativeness.

However, it is important to highlight that this is a pilot study that will serve as a foundation for larger-scale studies. Additionally, validated tools for the Portuguese population were used in this study. To our knowledge, this is the first study to investigate the relationship between weight status, sleep health, physical activity, and stress-related consumption in firefighters in Portugal.

Para o desempenho das suas funções os bombeiros devem ter um bom estado de saúde (1). Contudo, a nível da saúde ocupacional dos Bombeiros, apenas foi encontrado o programa "Saúde +", tem como objetivo atuar a nível da atividade física, nutrição e gestão do stress. Foi também encontrado um manual elaborado pela Direção Geral da Saúde e a Autoridade Nacional de Proteção Civil (1) com o intuito de sensibilizar os bombeiros e Corpos de Bombeiros, para a importância da adoção de um estilo de vida saudável. Deste modo, os resultados deste estudo apontam para a necessidade de serem desenvolvidos e, acima de tudo, implementados programas de promoção de saúde destinados a este grupo populacional.

#### *Limitações e Direções Futuras*

Tal como qualquer estudo este apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o seu desenho transversal não permite a extrapolação dos seus resultados. O tamanho reduzido da amostra (apenas 30 participantes) é outra limitação, apesar de termos tentado aumentar a amostra solicitando a partilha do questionário, em diferentes momentos, nas redes sociais. Além disso, o facto de os dados antropométricos terem sido autorreportados também apresenta uma limitação, pelo que os resultados devem ser interpretados com precaução. Por exemplo, segundo um estudo realizado em bombeiros (homens e mulheres) dos EUA (40) as mulheres subestimaram o peso mais que os homens e estes superestimaram mais a altura do que as mulheres. Além disso, o facto de a amostragem dos participantes ter sido efetuada através da técnica de bola de neve não permitiu um controlo sobre como se constituiu a amostra nem a sua representatividade.

Contudo, importa realçar que este é um estudo piloto que servirá de base para um estudo de maiores dimensões. Além disso, foram utilizadas ferramentas validadas para a população portuguesa. A nosso conhecimento este é o primeiro estudo a relacionar o estado ponderal, saúde do sono, a atividade física, e consumo alimentar sob condições de stress em bombeiros em Portugal.

## Conclusion

Our study found that body weight status was only positively correlated with age. Moreover, a high prevalence of overweight (pre-obesity and obesity) and low physical activity was observed. Work-related issues were cited as the most common barrier to physical activity. Median scores were obtained for sleep health based on the scale used. It was also observed that firefighters who reported a tendency to eat more in stressful situations also had a tendency to consume more sweets, fast food, and fewer fruits and vegetables.

The results of our study highlight the need for larger-scale studies, emphasizing the possible need for the development of prevention and intervention programs targeted at firefighters, with the goal of improving their sleep health, preventing overweight and obesity, increasing levels of physical activity, and managing eating habits in stressful situations. These programs may be important in promoting the health and well-being of firefighters and contributing to the improvement of their quality of life.

## Authors Contributions Statement

CO, MM, MS, SM and LO, conceptualization and study design; LO, data analysis; CO, MM, MS, SM, LO and CR, interpretation of results; CO, MM, MS, SM and LO, drafting, editing and reviewing; CO, MM, MS, SM and LO tables; LO, CR supervision and final writing.

## Funding

This study was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through the CBIOS projects UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020.

## 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.

## Conclusões

Verificou-se que o estado ponderal apenas estava correlacionado de forma positiva com a idade. Foi, ainda, encontrada uma prevalência de excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) elevada, bem como uma baixa atividade física. As questões laborais foram a razão mais mencionada como barreira à prática de atividade física. Quando à saúde do sono foi obtida uma pontuação mediana face à escala utilizada. Verificou-se ainda que quando se sentiam sob condições de stress os bombeiros que mencionaram ter tendência a comer mais, tinham também tendência a consumir mais doces, fast food e menos frutos e hortícolas.

Os resultados do nosso trabalho apontam para a necessidade da realização de um estudo de maiores dimensões, alertando desde já para a uma possível necessidade do desenvolvimento de programas de prevenção e intervenção dirigidos aos bombeiros com o intuito de melhorar a sua saúde do sono, prevenir o excesso de peso, aumentar os níveis de atividade física, e gerir os hábitos alimentares em situações de stress.

## Declaração sobre as contribuições dos autores

CO, MM, MS, SM e LO, conceção e desenho do estudo; LO análise dos dados; CO, MM, MS, SM, LO e CR, interpretação dos resultados; CO, MM, MS, SM e LO, redação, edição e revisão; CO, MM, MS, SM e LO, tabelas; LO e CR, supervisão e redação final.

## Financiamento

Este trabalho é financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através dos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020 do CBIOS.

## 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. DGS. (2018). Promoção de um Estilo de Vida Saudável nos Bombeiros Portugueses. Lisboa: Ministério da Administração Interna., Autoridade Nacional de Proteção Civil., Direção Geral da Saúde.
2. Instituto Nacional de Estatística. (2022). Bombeiros (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013), Sexo, Grupo etário e Tipo de vínculo; Anual. Disponível em: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0007233&xlang=pt&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0007233&xlang=pt&contexto=bd&selTab=tab2)
3. Ministério da Administração Interna. (2007). Decreto-Lei n.º 247/2007, de 27 de Junho. Diário da República n.º 122/2007, Série I de 2007-06-27.
4. Kaipust, C. M., Jahnke, S. A., Poston, W. S. C., Jitnarin, N., Haddock, C. K., Delclos, G. L., & Day, R. S. (2019). Sleep, Obesity, and Injury Among US Male Career Firefighters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 61(4), e150-e154. doi:10.1097/jom.0000000000001559
5. Brown, A. L., Wilkinson, M. L., Poston, W. S., Haddock, C. K., Jahnke, S. A., & Day, R. S. (2014). Adiposity predicts self-reported frequency of poor health days among male firefighters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 56(6), 667-672. doi:10.1097/jom.000000000000163
6. Soteriades, E. S., Hauser, R., Kawachi, I., Christiani, D. C., & Kales, S. N. (2008). Obesity and risk of job disability in male firefighters. *Occupational Medicine*, 58(4), 245-250. doi:10.1093/occmed/kqm153
7. Soteriades, E. S., Hauser, R., Kawachi, I., Liarokapis, D., Christiani, D. C., & Kales, S. N. (2005). Obesity and cardiovascular disease risk factors in firefighters: a prospective cohort study. *Obesity Research*, 13(10), 1756-1763. doi:10.1038/oby.2005.214
8. Poston, W. S., Haddock, C. K., Jahnke, S. A., Jitnarin, N., Tuley, B. C., & Kales, S. N. (2011). The prevalence of overweight, obesity, and substandard fitness in a population-based firefighter cohort. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 53(3), 266-273. doi:10.1097/JOM.0b013e31820af362
9. Rajabi, F., Molaieifar, H., Jahangiri, M., Taheri, S., Banaee, S., & Farhadi, P. (2020). Occupational stressors among firefighters: application of multi-criteria decision making (MCDM) Techniques. *Heliyon*, 6(4), e03820. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03820
10. Katsavouni, F., Bebetos, E., Malliou, P., & Beneka, A. (2016). The relationship between burnout, PTSD symptoms and injuries in firefighters. *Occupational Medicine*, 66(1), 32-37. doi:10.1093/occmed/kqv144
11. Bonnell, E. K., Huggins, C. E., Huggins, C. T., McCaffrey, T. A., Palermo, C., & Bonham, M. P. (2017). Influences on Dietary Choices during Day versus Night Shift in Shift Workers: A Mixed Methods Study. *Nutrients*, 9(3). doi:10.3390/nu9030193
12. St-Onge, M. P., Crawford, A., & Aggarwal, B. (2018). Plant-based diets: Reducing cardiovascular risk by improving sleep quality? *Current Sleep Medicine Reports*, 4(1), 74-78.
13. St-Onge, M. P., Roberts, A., Shechter, A., & Choudhury, A. R. (2016). Fiber and Saturated Fat Are Associated with Sleep Arousals and Slow Wave Sleep. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 12(1), 19-24. doi:10.5664/jcsm.5384
14. Khosla, T., & Lowe, C. R. (1967). Indices of obesity derived from body weight and height. *British Journal of Preventive and Social Medicine*, 21(3), 122-128. doi:10.1136/jech.21.3.122
15. Weir, C. B., & Jan, A. (2022). BMI Classification Percentile And Cut Off Points. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
16. Martins, R. (2017). Validação da Escala de Saúde do Sono (SATÉD) para a população adulta portuguesa. (Mestre em Psicologia Clínica e da Saúde). Universidade do Algarve, Algarve, Portugal.
17. Buysse, D. J. (2014). Sleep health: can we define it? Does it matter? *Sleep*, 37(1), 9-17. doi:10.5665/sleep.3298
18. Craig, C. L., Marshall, A. L., Sjöström, M., Bauman, A. E., Booth, M. L., Ainsworth, B. E., Pratt, M., Ekelund, U., Yngve, A., Sallis, J. F., & Oja, P. (2003). International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(8), 1381-1395. doi:10.1249/01.Mss.0000078924.61453.Fb
19. Association, W. M. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*, 310(20), 2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
20. Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Alarcão, V., Guiomar, S., Mota, J., Teixeira, P., Rodrigues, S., Lobato, L., Magalhães, V., Correia, D., Carvalho, C., Pizarro, A., Marques, A., Vilela, S., Oliveira, L., Nicola, P., Soares, S. & Ramos, E. (2017). Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: Relatório de resultados. Porto: Universidade do Porto.
21. Direção Nacional dos Bombeiros. (2021). Saúde e Seguranças dos Bombeiros - Relatório Final. Disponível em: [https://prociv.gov.pt/media/eowhtbei/relat%C3%B3rio-sa%C3%BAde-e-seguran%C3%A7a-dos-bombeiros\\_29122021.pdf](https://prociv.gov.pt/media/eowhtbei/relat%C3%B3rio-sa%C3%BAde-e-seguran%C3%A7a-dos-bombeiros_29122021.pdf)
22. Kling, H., Santiago, K., Benitez, L., Schaefer Solle, N., & Caban-Martinez, A. J. (2020). Characterizing Objective and Self-Reported Levels of Physical Activity Among Florida Firefighters Across Weight Status Category: A Cross-Sectional Pilot Study. *Workplace Health & Safety*, 68(11), 513-518. doi:10.1177/2165079920925505
23. Damacena, F. C., Batista, T. J., Ayres, L. R., Zandonade, E., & Sampaio, K. N. (2020). Obesity prevalence in Brazilian firefighters and the association of central obesity with personal, occupational and cardiovascular risk factors: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 10(3), e032933. doi:10.1136/bmjopen-2019-032933
24. Savall, A., Charles, R., Trombert, B., Fontana, L., Roche, F., & Pelissier, C. (2021). Prevalence of cardiovascular risk factors in a population of French firefighters. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 76(1), 45-51. doi:10.1080/19338244.2020.1779017
25. Chappel, S. E., Aisbett, B., Vincent, G. E., & Ridgers, N. D. (2016). Firefighters' Physical Activity across Multiple Shifts of Planned Burn Work. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10). doi:10.3390/ijerph13100973
26. European Commission. (2022). Desporto e atividade física. Disponível em: [https://www.portugalactivo.pt/sites/default/files/documentos\\_publicos/eurobarometro\\_portugal\\_-\\_desporto\\_e\\_atividade\\_fisica\\_2022.pdf](https://www.portugalactivo.pt/sites/default/files/documentos_publicos/eurobarometro_portugal_-_desporto_e_atividade_fisica_2022.pdf)
27. World Health Organization. (2020). WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour: at a glance. Geneva: World Health Organization.
28. Ras, J., Smith, D. L., Kengne, A. P., Soteriades, E. E., & Leach, L. (2022). Cardiovascular Disease Risk Factors, Musculoskeletal Health, Physical Fitness, and Occupational Performance in Firefighters: A Narrative Review. *Journal of Environmental and Public Health*, 2022, 7346408. doi:10.1155/2022/7346408

29. Sokoloski, M. L., Rigby, B. R., Bachik, C. R., Gordon, R. A., Rowland, I. F., Zumbro, E. L., & Duplanty, A. A. (2020). Changes in Health and Physical Fitness Parameters After Six Months of Group Exercise Training in Firefighters. *Sports (Basel)*, 8(11). doi:10.3390/sports8110143
30. Soteriades, E. S., Vogazianos, P., Tozzi, F., Antoniadis, A., Economidou, E. C., Psalta, L., & Spanoudis, G. (2022). Exercise and Occupational Stress among Firefighters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9). doi:10.3390/ijerph19094986
31. Lim, M., Jeong, K. S., Oh, S. S., Koh, S. B., Chang, S. J., & Ahn, Y. S. (2020). Effects of Occupational and Leisure-Time Physical Activities on Insomnia in Korean Firefighters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15). doi:10.3390/ijerph17155397
32. McGillis, Z., Dorman, S. C., Robertson, A., Larivière, M., Leduc, C., Eger, T., Oddson, B. E., & Larivière, C. (2017). Sleep Quantity and Quality of Ontario Wildland Firefighters Across a Low-Hazard Fire Season. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 59(12), 1188-1196. doi:10.1097/jom.0000000000001175
33. Lim, M., Lee, S., Seo, K., Oh, H. J., Shin, J. S., Kim, S. K., Kang, H. T., Jeong, K. S., Oh, S. S., Koh, S. B. & Ahn, Y. S. (2020). Psychosocial factors affecting sleep quality of pre-employed firefighters: a cross-sectional study. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 32, e12. doi:10.35371/aoem.2020.32.e12
34. Jeong, K. S., Ahn, Y. S., Jang, T. W., Lim, G., Kim, H. D., Cho, S. W., & Sim, C. S. (2019). Sleep Assessment During Shift Work in Korean Firefighters: A Cross-Sectional Study. *Safety and Health at Work*, 10(3), 254-259. doi:10.1016/j.shaw.2019.05.003
35. Stout, J. W., Beidel, D. C., Brush, D., & Bowers, C. (2021). Sleep disturbance and cognitive functioning among firefighters. *Journal of Health Psychology*, 26(12), 2248-2259. doi:10.1177/1359105320909861
36. Khumtong, C., & Taneepanichskul, N. (2019). Posttraumatic stress disorder and sleep quality among urban firefighters in Thailand. *Nature and Science of Sleep*, 11, 123-130. doi:10.2147/nss.S207764
37. Zellner, D. A., Loaiza, S., Gonzalez, Z., Pita, J., Morales, J., Pecora, D., & Wolf, A. (2006). Food selection changes under stress. *Physiology & Behavior*, 87(4), 789-793. doi:10.1016/j.physbeh.2006.01.014
38. Leow, S., Beer, N. J., Guelfi, K. J., Rebar, A. L., Alderson, J. A., Jackson, B., & Dimmock, J. A. (2021). Perceived daily tension and food cravings and consumption: A within- and between-person investigation. *Eating Behaviors*, 40, 101473. doi:10.1016/j.eatbeh.2020.101473
39. Rodrigues, S., Paiva, J. S., Dias, D., & Cunha, J. P. S. (2018). Stress among on-duty firefighters: an ambulatory assessment study. *PeerJ*, 6, e5967. doi:10.7717/peerj.5967
40. Hsiao, H., Weaver, D., Hsiao, J., Whitestone, J., Kau, T. Y., Whisler, R., & Ferri, R. (2014). Comparison of measured and self-reported anthropometric information among firefighters: implications and applications. *Ergonomics*, 57(12), 1886-1897. doi:10.1080/00140139.2014.952351.

## Social networks and food choice of adolescents from a school in the Lisbon region

.....

## As redes sociais e a escolha alimentar de adolescentes de uma escola da região de Lisboa

Ana Carina Almeida <sup>1</sup> & Bruno Sousa <sup>1,2,3</sup>  **Keywords:** Adolescents, food choices, Lisbon, social networks**Palavras-chave:** Adolescentes, escolhas alimentares, Lisboa, redes sociais**To Cite:**

Almeida, A. C. & Sousa B. (2023) Social networks and food choice of adolescents from a school in the Lisbon region. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 51-63.

 [10.19277/bbr.20.1.310](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.310)

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

2 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

3 - Health Service of Autonomous Region of Madeira

Correspondence to / Correspondência a:  
[bruno.sousa@ulusofona.pt](mailto:bruno.sousa@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 14/02/2023  
Accepted / Aceite: 12/06/2023

**Abstract**

The use of social networks (SNs) leads to the development of autonomy and identity construction by young people, which may influence their food choices. The aim of this cross-sectional observational quantitative study was to determine the relationship between SNs and food choices of adolescents from a secondary school in the Lisbon region, according to the time of SN use. Data were collected at school using a Google Forms questionnaire for adolescents aged 16-19 years who used SNs. A sample of 176 participants was obtained. Of these adolescents, 60.2% used SNs less than four hours daily, while 39.8% used SNs more than four hours. In the lower SN usage group, the majority were boys (53.80%), while the majority were girls (61.40%) in the higher usage group ( $p < 0.05$ ). No statistically significant differences between adolescents who use the SNs less than or more than four hours daily were detected. In this study, no relationship was found between time in SNs and adolescents' food choices. Further studies on this topic will be necessary.

**Resumo**

A utilização de redes sociais (RS) leva ao desenvolvimento de autonomia e construção de identidade por parte dos jovens, e pode influenciar as suas escolhas alimentares. O objetivo deste estudo quantitativo observacional transversal foi determinar a relação entre as RS e as escolhas alimentares de adolescentes de uma escola secundária da região de Lisboa, em função do tempo de utilização de RS. A recolha dos dados foi feita na escola, através de um questionário Google Forms destinado a adolescentes com idades entre os 16 e os 19 anos, que utilizassem RS. Obteve-se uma amostra de 176 participantes. Destes adolescentes, 60,2% utilizavam as RS menos de quatro horas diárias e os restantes mais de quatro horas. No grupo com menos tempo nas RS a maioria eram rapazes (53,80%) e no grupo que utiliza mais horas diárias a maioria era raparigas (61,40%) ( $p < 0,05$ ). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os adolescentes que utilizam os RS menos ou mais de quatro horas por dia. Neste estudo, não foi encontrada relação entre o tempo nas RS e as escolhas alimentares dos adolescentes. Mais estudos sobre este tema serão necessários.

## Introduction

Adolescence is a period of transition from childhood to adulthood, corresponding to ages between 10 and 19 years, according to the World Health Organization (1). This is a period of explosive development both physically and psychologically, especially during puberty, which is characterized by an increase in risk behaviours and emotional swings (2). Thus, encouraging healthy eating in adolescents is not easy, since this age group is highly influenced by external environmental factors and environment (3).

Currently, young adolescents grow up in a society where digital technology is increasingly developed. Social networks (SNs) occupy a large part of their leisure time, and in recent years screen time has been increasing significantly (4). More than 90% of adolescents have at least one account on SNs (5).

The use of these digital platforms leads to the development of autonomy and identity construction by young people, contributing to the shaping of their personality, which will have an influence on their lifestyle habits (6).

In addition, marketing strategies are very well outlined and increasingly the focus is on the digital medium. Advertising through public figures and influencers has teenagers as the main target audience, which can be worrying, as this age group has a lower critical sense towards marketing strategies than the older public, thus becoming more vulnerable (7).

Social norms also seem to have an impact on eating behaviour, i.e., publications about certain foods, recipes or restaurants that become trendy, seem to influence adolescents' food choice, increasing their consumption (8).

SNs could be an excellent strategy for food education, as it is a place where adolescents spend much of their time (9). Early learning, exposure to new ideas and access to informative nutrition content could be beneficial for adolescents (10). However, while they can be a good means for health promotion, the best strategy for their use is not entirely clear (11).

## Introdução

A adolescência é um período de transição da infância para a vida adulta, correspondendo a idades entre os 10 e os 19 anos, segundo a Organização Mundial de Saúde (1). Este é um período de desenvolvimento explosivo quer a nível físico como psicológico, sobretudo na fase da puberdade, caracterizada por um aumento dos comportamentos de risco e oscilações emocionais. (2). Deste modo, o incentivo a uma alimentação saudável nos adolescentes não é fácil, uma vez que esta faixa etária é altamente influenciada por fatores ambientais externos e meio envolvente (3).

Atualmente, os jovens adolescentes crescem numa sociedade onde a tecnologia digital se encontra cada vez mais desenvolvida. As redes sociais (RS) ocupam grande parte dos seus tempos livres, sendo que nos últimos anos o tempo de ecrã tem vindo a aumentar significativamente (4). Mais de 90% dos adolescentes têm pelo menos uma conta nas RS (5).

A utilização destas plataformas digitais leva ao desenvolvimento de autonomia e construção de identidade por parte dos jovens, contribuindo para a moldagem da sua personalidade, o que vai ter influência nos seus hábitos de vida (6).

Para além disso, as estratégias de marketing estão muito bem delineadas e cada vez mais o foco é o meio digital. A publicidade através de figuras públicas e *influencers* tem como principal público-alvo os adolescentes, o que poderá ser preocupante, uma vez que esta faixa etária tem um menor sentido crítico perante estratégias de marketing face ao público mais velho, tornando-se assim mais vulnerável (7).

As normas sociais parecem ter também impacto no comportamento alimentar, isto é, publicações sobre determinados alimentos, receitas ou restaurantes que se tornam tendência, parecem influenciar a escolha alimentar dos adolescentes, aumentando o consumo dos mesmos (8).

As RS poderão ser uma excelente estratégia de educação alimentar, uma vez que é um local onde os adolescentes passam grande parte do seu tempo (9). A aprendizagem precoce, a exposição a novas ideias e o acesso a conteúdos informativos de nutrição poderão ser benéficos para os adolescentes (10). Contudo, apesar de poderem ser um bom meio para promoção de saúde, não está totalmente claro qual a melhor estratégia para tal (11).

The content about food available on SNS is increasingly common and easily triggers sensations in those who follow them, impacting food cravings, albeit unconsciously (12).

There is an increasing intervention by organisations and health professionals in SNS, with more and more online engagement with the general public (13). Many young people now use SNS for health content searches (13).

It is, therefore, of utmost importance to understand the adolescents' eating behaviour and how the SNS may influence them, so that nutritionists can develop strategies for food education in the digital environment, ensuring good nutritional literacy from an early age.

On the other hand, there are no known studies on this topic in Portugal and international information is scarce.

The aim of this study was to determine the relationship between SNS and food choice of adolescents aged 16-19 years old from a secondary school in the Lisbon region, according to the time of SNS use.

## **Materials and Methods**

This study is a quantitative observational cross-sectional study.

This study was carried out at Escola Secundária de Caneças, which had ten classes of 10th grade, 11th grade and 12th grade, with a total of 720 students. Three classes from each of these years were randomly selected, totalling 223 students, however, informed consent was only obtained from 192 adolescents. Taking into account the exclusion criteria: the non-use of SNS and ages below 16 years and above 19 years, 1 and 15 students, respectively, were excluded, thus the final sample composition was 176 adolescents.

After the authorisation from the Directorate, and the consent from the adolescents' parents/guardians, all participants, prior to data collection, agreed to participate in the study, giving their written informed consent to participate. Before completing the questionnaire, the purpose of the study and the variables to be assessed were described, ensuring data anonymity. This study was conducted following the ethical standards established in the Declaration of Helsinki.

O conteúdo sobre alimentação disponível nas RS é cada vez mais comum e facilmente despoleta sensações em quem o acompanha, impactando no desejo alimentar, ainda que seja de forma inconsciente (12).

Existe uma intervenção crescente por parte das organizações e profissionais de saúde nas RS, havendo cada vez mais um maior envolvimento online com o público em geral (13). Atualmente muitos jovens utilizam as RS para pesquisas de conteúdos de saúde (13).

É assim de extrema importância compreender o comportamento alimentar dos adolescentes e perceber de que forma as RS poderão influenciar, de modo a desenvolverem-se estratégias de educação alimentar por parte dos nutricionistas no meio digital, garantindo uma boa literacia nutricional desde cedo.

Por outro lado, em Portugal não se conhecem trabalhos realizados sobre esta temática e a informação a nível internacional é escassa.

O objetivo deste estudo foi determinar a relação entre as RS e as escolhas alimentares de adolescentes entre os 16 e os 19 anos de idade de uma escola secundária da região de Lisboa, em função do tempo de utilização de RS.

## **Materiais e Métodos**

O presente estudo consiste num estudo quantitativo observacional transversal.

Este trabalho foi desenvolvido na Escola Secundária de Caneças que tinha 10 turmas de 10º ano, de 11º ano e de 12º ano, num total de 720 alunos. Foram selecionadas aleatoriamente 3 turmas de cada um destes anos, perfazendo 223 alunos, contudo só foi obtido o consentimento informado de 192 adolescentes. Tendo em conta os critérios de exclusão: a não utilização de RS e idades inferiores a 16 anos e superiores a 19 anos, foram excluídos respetivamente 1 e 15 alunos, e a amostra foi então constituída por 176 adolescentes.

Após a autorização da Direção, e o consentimento dos pais/encarregados de educação dos adolescentes, todos os participantes, antes da recolha dos dados, concordaram em participar do estudo, dando o seu consentimento por escrito e informado para participar. Antes do preenchimento do questionário, foram descritos o objetivo do estudo e as variáveis



Data collection was made on May 9, 2022, using a Google Forms questionnaire. The study was presented to the students in a classroom setting, where a QR code to access the form was provided and the students responded individually on their mobile phones.

The questionnaire used for data collection consisted of fifteen questions and was divided into four sections. The first section was composed of personal information such as age, sex and the level of concern about food ("None", "Little", "Fair" or "A lot"). The second with three questions, namely about the use of SNS, which SNS are the most used and the number of daily hours of use. The third section with six questions: whether you follow and type of beads related to food; whether you have ever tried recipes from these beads; and the remaining four questions in this section were about the relationship of these beads with your eating routine, namely in the preparation of recipes, going to restaurants, consumption of healthy food and the amount eaten ("Increased", "Maintained", "Decreased"). Finally, the fourth section, with three questions, involving a food frequency questionnaire with the various food groups (Fruit, Vegetables, Sweet Snacks, Salty Snacks, Fast-Food, and Soft Drinks); another question on whether they consider that the information on food present on social media, to a certain extent, can replace a consultation with a nutritionist; and a question on whether they consider that the content present on social media has an influence on their food choices.

After closing the questionnaire in Google Forms, the answers were extracted into a Microsoft Excel document, where the 16 participants were eliminated according to the exclusion criteria of the study. All answers were then coded and the results extrapolated to IBM SPSS 28.0.1 - Statistical Package for the Social Sciences. Nominal variables are presented as percentage and absolute value and quantitative variables as mean and standard deviation. The distribution of selected characteristics between the groups was compared using Pearson's chi-square test for categorical variables. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

a serem avaliadas, garantindo-se o anonimato dos dados. Este estudo foi realizado seguindo os padrões éticos estabelecidos na Declaração de Helsinque de 1964.

A recolha dos dados foi feita no dia 9 de maio de 2022, através de um questionário *Google Forms*. O estudo foi apresentado aos alunos em ambiente de sala de aula, onde foi fornecido um *QR code* de acesso ao formulário e os alunos responderam individualmente nos seus telemóveis.

O questionário utilizado para a recolha de dados era composto por quinze questões, sendo que se encontrava dividido em quatro secções. A primeira secção era composta por informações pessoais como idade, sexo e o nível de preocupação com a alimentação ("Nenhuma", "Pouca", "Razoável" ou "Muita"). A segunda com três questões, nomeadamente quanto à utilização de RS, qual a RS mais utilizada e o número de horas diárias de utilização. A terceira secção com seis questões: se segue e tipo de contas relacionadas com a alimentação; se alguma vez experimentou receitas dessas contas; e as restantes quatro questões desta secção eram sobre a relação destas contas com a rotina alimentar, nomeadamente na elaboração de receitas, ida a restaurantes, consumo de alimentos saudáveis e a quantidade ingerida ("Aumentou", "Manteve", "Diminuiu"). Por fim, a quarta secção, com três questões, envolvendo um questionário de frequência alimentar com os vários grupos alimentares (Fruta, Hortícolas, Snacks doces, Snacks salgados, Fast-Food, Refrigerantes e bebidas açucaradas); uma outra questão sobre se considera que a informação sobre alimentação presente nas redes sociais, de certo modo, pode substituir a consulta com um nutricionista; e uma questão sobre se considera que o conteúdo presente nas redes sociais tem influência nas suas escolhas alimentares.

Após o encerramento do questionário no *Google Forms*, procedeu-se à extração das respostas para um documento *Microsoft Excel*, onde foram eliminados os 16 participantes de acordo com os critérios de exclusão do estudo. Seguidamente, codificaram-se todas as respostas e extrapolou-se os resultados para o programa de análise estatística IBM SPSS 28.0.1 - *Statistical Package for the Social Sciences*. As variáveis nominais estão apresentadas em percentagem e valor absoluto e as variáveis quantitativas estão em média e desvio-padrão. Comparou-se a distribuição das características selecionadas entre os grupos usando o teste qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

**Table 1** - Characterization of the sample according to the time of use of SN.  
**Tabela 1** - Caracterização da amostra, em função do tempo de utilização de RS.

	<b>Total population / População Total</b> (n=176)	<b>≤ 4 hours / horas</b> (n=106)	<b>&gt; 4 hours / horas</b> (n=70)	<b>p-Value<sup>a</sup> / Valor de p<sup>a</sup></b>
<b>Sex / Sexo, % (n)</b>				
Female / Feminino	52.30 (92)	46.20 (49)	61.40 (43)	0.048
Male / Masculino	47.70 (84)	53.80 (57)	38.60 (27)	
<b>Age, years / Idade, anos</b>	16.98 (0.90)	16.93 (0.93)	17.06 (0.85)	0.374
<b>Food preoccupation / Preocupação com alimentação, % (n)</b>				
None / Nenhuma	6.80 (12)	9.40 (10)	2.90 (2)	0.065
Little / Pouca	9.70 (17)	11.30 (12)	7.10 (5)	
Reasonable / Razoável	58.50 (103)	50.90 (54)	70.00 (49)	
A lot / Muita	25.00 (44)	20.00 (30)	25.00 (14)	
<b>Social network most used/Rede social mais utilizada, % (n)</b>				
Instagram	48.30 (85)	55.70 (59)	37.10 (26)	0.091
Youtube	13.10 (23)	12.30 (13)	14.30 (10)	
Twitter	8.00 (14)	5.70 (6)	11.40 (8)	
Tik Tok	30.70 (54)	26.40 (28)	37.10 (26)	
<b>Follow accounts related to food / Segue contas relacionadas com alimentação, % (n)</b>				
Yes / Sim	56.30 (99)	59.40 (63)	51.40 (36)	0.295
No / Não	43.80 (77)	40.60 (43)	48.60 (34)	

Data expressed as mean (standard deviation) or percentage (n). Abbreviation: SN, Social Networks. <sup>a</sup> P values for comparisons between groups were tested by Pearson  $\chi^2$ . / Dados expressos em média (desvio padrão) ou percentagem (n). Abreviatura: RS, Redes Sociais. <sup>a</sup> os valores de P para comparações entre grupos foram testados pelo Pearson  $\chi^2$ .

## Results

This study was composed of a sample of 176 adolescents. The average daily time spent using social networks was 4 hours, with a variation between 30 minutes and 16 hours daily (SD=2.87). Of these adolescents, 106 used social networks less than 4 hours daily, while 70 said they used more than 4 hours daily.

In Table 1, it is possible to analyse the characterisation of the sample according to the time of SN use.

Of the 176 adolescents who participated in the study, 52.30% were female (n=92). In the group that uses SNs less time, most were male (53.80%) and in the group that uses more hours daily, most were female (61.40%), with statistically significant differences in gender between groups.

## Resultados

Este estudo foi composto por uma amostra de 176 adolescentes. A média de tempo de utilização de redes sociais foi de 4 horas diárias, havendo uma variação entre 30 minutos e 16 horas diárias (DP=2,87). Destes jovens, 106 utilizavam as redes sociais menos de 4 horas diárias, enquanto 70 afirmaram utilizar mais de 4 horas diárias.

Na Tabela 1 é possível analisar a caracterização da amostra, em função do tempo de utilização de RS.

Dos 176 adolescentes que participaram no estudo, 52,30% eram do sexo feminino (n=92). No grupo que utiliza menos tempo as RS a maioria era do sexo masculino (53,80%) e no grupo que utiliza mais horas diárias a maioria era do sexo feminino (61,40%), havendo diferenças estatisticamente significativas quanto ao sexo entre os grupos.

The mean age of the sample was 16.98 years (SD=0.90), ranging between 16 and 19 years old. There were no statistically significant differences in age between the groups.

Regarding the level of concern about food, the majority (58.5%), reported having a "Reasonable" concern, with no statistical significance between the groups.

The SN most used by adolescents is *Instagram* (48.30%) and the second is *Tik Tok* (30.70%). However, no statistically significant differences were found between the groups. When asked whether they followed food-related accounts more than half answered "Yes" in both groups, however this percentage was higher in the group that uses SNs less than 4 hours daily (55.70%).

Those who stated that they follow food-related accounts on the SNs (n=99) were asked what type of account they mostly follow. 41.40% of the adolescents stated that they follow "Influencers", with "Nutritionists" being the option with the second most answers, with 23.20%. Table 2 analyses the type of food-related accounts and their relationship on the adolescents' eating habits according to the time of SN use.

When questioned about the preparation of recipes from these same accounts, the vast majority (82.8%) answered "Yes". As for the relationship that these accounts have on the eating habits, they were asked about the preparation of recipes, trips to restaurants, consumption of healthy food and the amount eaten. We can see that 72.70% reported an increase in the preparation of recipes, and as for restaurant visits, around 54.50% reported that they remained the same. The distribution of this answer was similar in both groups. In relation to the consumption of healthy food, 56.60% reported increasing consumption. With regard to the quantity ingested, the answer was unanimous in both groups, with the great majority replying "It remained the same". There were no significant differences between the groups.

Table 3 shows the frequency of consumption of several food groups by adolescents according to the time of use of SNs. However, there were no statistically significant differences between the groups regarding all food categories.

Table 4 represents the adolescents' perception of the influence of SNs according to the time of SN use.

A média de idades da amostra foi de 16,98 anos (DP=0,90), tendo uma variação entre 16 e 19 anos de idade. Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à idade, entre os grupos.

Quanto ao nível de preocupação com a alimentação, a maioria (58,5%), reportou ter uma preocupação "Razoável", não havendo significância estatística entre os grupos.

A RS mais utilizada pelos adolescentes é o *Instagram* (48,30%) e a segunda o *Tik Tok* (30,70%). Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Quando questionados se seguiam contas relacionadas com alimentação mais de metade respondeu "Sim" em ambos os grupos, contudo essa percentagem foi mais elevada no grupo que utiliza as RS menos de 4 horas diárias (55,70%).

A quem afirmou seguir contas relacionadas com alimentação nas RS (n=99), questionou-se qual o tipo de conta que seguiam maioritariamente. 41,40% dos adolescentes afirmaram seguir "Influencers", sendo a opção "Nutricionistas" a segunda com mais respostas, com 23,20%. A Tabela 2 analisa os que seguiam contas relacionadas com alimentação e a sua relação com a rotina alimentar dos adolescentes, em função do tempo de utilização de RS.

Quando questionados quanto à elaboração de receitas dessas mesmas contas, a grande maioria (82,8%) respondeu "Sim". Quanto à relação que essas contas têm sobre a rotina alimentar, questionou-se relativamente à elaboração de receitas, idas a restaurantes, consumo de alimentos saudáveis e quantidade ingerida. Verifica-se que 72,70% referiu aumentar a elaboração de receitas, e quanto às idas a restaurantes, cerca de 54,50% referiu que manteve-se igual. A distribuição desta resposta foi semelhante em ambos os grupos. Relativamente ao consumo de alimentos saudáveis, 56,60% referiu aumentar o consumo. Quanto à quantidade ingerida, a resposta foi unânime em ambos os grupos, respondendo a grande maioria "Manteve-se". Não houve diferenças significativas entre os grupos.

Na Tabela 3 é possível analisar a frequência de consumo de vários grupos alimentares dos adolescentes, em função do tempo de utilização de RS. Contudo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, relativamente a todas as categorias de alimentos.

A Tabela 4 representa a percepção dos adolescentes quanto à influência das RS, em função do tempo de utilização de RS.

**Table 2** - Tracking of food-related accounts and their relationship with adolescents' eating habits as a function of time of SN use.

**Tabela 2** - Seguimento de contas relacionadas com alimentação e a sua relação com os hábitos alimentares dos adolescentes, em função do tempo de utilização de RS.

	Total / Total (n=99)	≤ 4 hours / horas (n=63)	> 4 hours / horas (n=36)	p-value <sup>a</sup> / Valor de p <sup>a</sup>
<b>Type of food accounts / Tipo de contas de alimentação, % (n)</b>				
Nutritionists / Nutricionistas	23.20 (23)	27.00 (17)	16.70 (6)	0.284
Chefs / Chefes	19.20 (19)	22.20 (14)	13.90 (5)	
Influencers	41.40 (41)	33.30 (21)	55.60 (20)	
Brands / Marcas	5.10 (5)	4.80 (3)	5.60 (2)	
Others / Outras	11.10 (11)	8.10 (8)	3.00 (3)	
<b>Recipe preparation from these accounts / Elaboração de receitas dessas contas, % (n)</b>				
Yes / Sim	82.80 (82)	81.00 (51)	86.10 (31)	0.513
No / Não	17.20 (17)	19.00 (12)	13.90 (5)	
<b>Impact these accounts have on eating habits / Relação que essas contas têm sobre os hábitos alimentares, % (n)</b>				
<b>Recipe preparation / Elaboração de receitas</b>				
Increased / Aumentou	72.70 (72)	69.80 (44)	77.80 (28)	0.394
Maintained / Manteve	27.30 (27)	30.20 (19)	22.20 (8)	
<b>Going to restaurants / Ida a restaurantes</b>				
Increased / Aumentou	34.30 (34)	30.20 (19)	41.70 (15)	0.288
Maintained / Manteve	54.50 (54)	55.60 (35)	52.80 (19)	
Decreased / Diminuiu	11.10 (11)	14.30 (9)	5.60 (2)	
<b>Healthy food consumption / Consumo de alimentos saudáveis</b>				
Increased / Aumentou	56.60 (56)	60.30 (38)	50.00 (18)	0.319
Maintained / Manteve	43.40 (43)	39.70 (25)	50.00 (18)	
<b>Quantity ingested / Quantidade Ingerida</b>				
Increased / Aumentou	13.10 (13)	15.90 (10)	8.30 (3)	0.565
Maintained / Manteve	73.7 (73)	71.40 (45)	77.80 (28)	
Decreased / Diminuiu	13.10 (13)	12.70 (8)	13.90 (5)	

Data expressed in percentage (n). Abbreviation: SN, Social Networks. <sup>a</sup> P values for comparisons between groups were tested by Pearson  $\chi^2$ . / Dados expressos em percentagem (n). Abreviatura: RS, Redes Sociais. <sup>a</sup> os valores de P para comparações entre grupos foram testados pelo Pearson  $\chi^2$ .

When asked whether the information in SNs replaces a nutrition consultation, 84.10% answered "No", with a similar distribution of answers in each of the groups.

When asked if the content present in the SNs influences food choices, 49.40% answered "Yes" and 50.60% answered "No". There were no statistically significant differences between the groups.

Quando questionados se a informação presente nas RS substitui uma consulta de nutrição, 84,10% respondeu "Não", havendo uma distribuição semelhante de respostas em cada um dos grupos.

Quando questionados se o conteúdo presente nas RS influencia as escolhas alimentares, 49,40% respondeu "Sim" e 50,60% respondeu "Não". Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

**Table 3** - Frequency of consumption of some food groups as a function of time of SN use (*continued next page*).  
**Tabela 3** - Frequência de consumo de alguns grupos alimentares, em função do tempo de utilização de RS (*continua na página seguinte*).

	Total / Total (n=176)	≤ 4 hours / horas (n=106)	> 4 hours / horas (n=70)	p-value <sup>a</sup> / Valor de p <sup>a</sup>
<b>Fruit / Frutas, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	4.00 (7)	3.80 (4)	4.30 (3)	0.369
1-3 per month / 1-3 por mês	5.70 (10)	4.70 (5)	7.10 (5)	
1 per week / 1 por semana	19.90 (35)	18.90 (20)	21.40 (15)	
2-4 per week / 2-4 por semana	25.60 (45)	20.80 (22)	32.90 (23)	
5-6 per week / 5-6 por semana	6.80 (12)	7.50 (8)	5.70 (4)	
1 per day / 1 por dia	19.90 (35)	24.50 (26)	12.90 (9)	
2 or > per day / 2 ou > por dia	18.20 (32)	19.80 (21)	15.70 (11)	
<b>Vegetables / Hortícolas, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	4.00 (7)	3.80 (4)	4.30 (3)	0.946
1-3 per month / 1-3 por mês	4.50 (8)	4.70 (5)	4.30 (3)	
1 per week / 1 por semana	27.30 (48)	26.40 (28)	28.60 (20)	
2-4 per week / 2-4 por semana	22.70 (40)	20.80 (22)	25.70 (18)	
5-6 per week / 5-6 por semana	13.10 (23)	15.10 (16)	10.00 (7)	
1 per day / 1 por dia	17.60 (31)	18.90 (20)	15.70 (11)	
2 or > per day / 2 ou > por dia	10.80 (19)	10.40 (11)	11.40 (8)	
<b>Sweet snacks / Snacks doces, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	0.60 (1)	0.90 (1)	0	0.536
1-3 per month / 1-3 por mês	9.70 (17)	10.40 (11)	8.60 (6)	
1 per week / 1 por semana	24.40 (43)	24.50 (26)	24.30 (17)	
2-4 per week / 2-4 por semana	27.30 (48)	27.40 (29)	27.10 (19)	
5-6 per week / 5-6 por semana	10.80 (19)	9.40 (10)	12.90 (9)	
1 per day / 1 por dia	18.80 (33)	21.70 (23)	14.30 (10)	
2 or > per day / 2 ou > por dia	8.50 (15)	5.70 (6)	12.90 (9)	
<b>Salty snacks/Snacks salgados, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	3.40 (6)	4.70 (5)	1.40 (1)	0.242
1-3 per month / 1-3 por mês	21.60 (38)	21.70 (23)	21.40 (15)	
1 per week / 1 por semana	31.80 (56)	34.90 (37)	27.10 (19)	
2-4 per week / 2-4 por semana	29.00 (51)	25.50 (27)	34.30 (24)	
5-6 per week / 5-6 por semana	5.10 (9)	6.60 (7)	2.90 (2)	
1 per day / 1 por dia	6.30 (11)	5.70 (6)	7.10 (5)	
2 or > per day / 2 ou > por dia	2.80 (5)	0.90 (1)	5.70 (4)	
<b>Fast-food, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	11.90 (21)	16.00 (17)	5.70 (4)	0.064
1-3 per month / 1-3 por mês	38.60 (68)	39.60 (42)	37.10 (4)	
1 per week / 1 por semana	38.60 (68)	34.90 (37)	44.30 (31)	
2-4 per week / 2-4 por semana	8.00 (14)	6.60 (7)	10.00 (7)	
5-6 per week / 5-6 por semana	1.70 (3)	2.80 (3)	0	
1 per day / 1 por dia	1.10 (2)	0	2.90 (2)	

Table 3 - Continued / Tabela 3 - Continuação

	Total / Total (n=176)	≤ 4 hours / horas (n=106)	> 4 hours / horas (n=70)	p-value <sup>a</sup> / Valor de p <sup>a</sup>
<b>Soft drinks/ Refrigerantes, % (n)</b>				
Never or <1 per month / Nunca ou < 1 por mês	19.90 (35)	22.60 (24)	15.70 (11)	
1-3 per month / 1-3 por mês	21.00 (37)	23.60 (25)	17.10 (12)	
1 per week / 1 por semana	29.00 (51)	25.50 (27)	34.30(24)	
2-4 per week / 2-4 por semana	14.80 (26)	17.00 (18)	11.40 (8)	0.35
5-6 per week / 5-6 por semana	4.00 (7)	2.80 (3)	5.70 (4)	
1 per day / 1 por dia	4.00 (7)	2.80 (3)	5.70 (4)	
2 or > per day / 2 ou > por dia	7.40 (13)	5.70 (6)	10.00 (7)	

Data expressed in percentage (n). <sup>a</sup> P values for comparisons between groups were tested by Pearson  $\chi^2$  /  
Dados expressos em percentagem (n). <sup>a</sup> os valores de P para comparações entre grupos foram testados pelo Pearson  $\chi^2$ .

**Table 4 - Adolescents' perceptions of the influence of SNs as a function of time of SN use.**

**Tabela 4 - Percepção dos adolescentes quanto à influência das RS, em função do tempo de utilização de RS.**

	Total population / População Total (n=176)	≤ 4 hours / horas (n=106)	> 4 hours / horas (n=70)	p-value <sup>a</sup> / Valor de p <sup>a</sup>
<b>Information on SN replaces a nutrition consultation / A informação nas RS substitui a consulta de nutrição, % (n)</b>				
Yes / Sim	15.90 (28)	14.20 (15)	18.60 (13)	
No / Não	84.10 (148)	85.80 (91)	81.40 (57)	0.433
<b>The content of SN influences food choices / O conteúdo presente nas RS influencia as escolhas alimentares, % (n)</b>				
Yes / Sim	49.40 (87)	48.10 (51)	51.40 (36)	
No / Não	50.60 (89)	51.90 (55)	48.60 (34)	0.667

Data expressed in percentage (n). Abbreviation: SN, Social Networks. <sup>a</sup> P values for comparisons between groups were tested by Pearson  $\chi^2$ . / Dados expressos em percentagem (n). Abreviatura: RS, Redes Sociais. <sup>a</sup> os valores de P para comparações entre grupos foram testados pelo Pearson  $\chi^2$ .

## Discussion

According to the results obtained, *Instagram* seems to be the social network most used by these adolescents. A study developed in a sample of young people aged between 15 and 21 years refers the same preference (14). This information will be useful for health professionals and health institutions so that they can act strategically, if necessary, since it is the SN most used by adolescents.

The average number of hours of daily SN use in this study was 4 hours. However, a recent study published on the We Are Social website states that this figure is quite variable from country to country. In the Philippines, the average daily hours is 4 hours and 15 minutes, while in Japan it is only 51 minutes. This factor variability could trigger different outcomes in different countries (15).

## Discussão

De acordo com os resultados obtidos, o *Instagram* parece ser a rede social mais utilizada por estes adolescentes. Um estudo desenvolvido numa amostra de jovens entre os 15 e os 21 anos refere a mesma preferência (14). Esta informação será útil para profissionais e órgãos de saúde, para que estes possam atuar estrategicamente, caso seja necessário, uma vez que é a RS mais utilizada por adolescentes.

A média de horas de utilização diária de RS neste estudo foi de 4 horas. Contudo, um estudo recente publicado no site We Are Social afirma que esse valor é bastante variável de país para país. Nas Filipinas a média de horas diárias é de 4 horas e 15 minutos, enquanto no Japão são apenas 51 minutos. Esse fator sendo variável poderá desencadear resultados diferentes em países distintos (15).

The group that uses more hours daily the SNS showed more frequent consumption of *fast-food*, although not statistically significant. A study was conducted in Australia on adolescents using SNS, which assessed the impact of *fast-food* advertising on adolescents' consumption intention. According to these authors, *fast-food* advertisements seem to influence and increase the likelihood of eating this type of food (16). On the other hand, in a recent review based on a study conducted between 2017 and 2022, it was reported that food advertisements on social media often focus on promoting the consumption of unhealthy foods and beverages, and that this fact is associated with increased consumption among adolescents (17). This may justify this consumption, since individuals who spend more time in SNS are more exposed to advertising.

Most adolescents who follow food-related accounts on SNS stated that these accounts have an impact on increasing consumption of healthy foods and recipe preparation. According to a study also developed in Lisbon, the same was found, and the accounts from which they try more recipes are from nutritionists (12). In another study in Greek adolescents and young adults, publications on healthy eating and new recipes were also found to be inspiring, and although images of appealing but less nutritious foods seemed to create the need for participants to consume these foods, the majority ended up not doing so (18).

Of the adolescents who followed food-related accounts on SNS, the majority claimed to follow mostly influencers, with this value being higher in the group of youngsters who use SNS for more than 4 hours a day, despite the fact that it does not present statistical significance. According to Kucharczuk, the presence of *influencers* and public figures in food and beverage advertising campaigns in their SNS influences adolescents, especially in the consumption of unhealthy foods (5). Thus, the group that uses more SNS hours seems to be more exposed to this type of temptation.

When asked if they considered that SNS influenced their food choices, the answers were divided between "Yes" and "No". However, in a study developed in Porto in 2018, also in a sample of adolescents, the exact same question was asked and the majority (60.00%) answered "Yes", assuming that SNS influenced their food choices (14). The answer to this question is only a self-perception of the adolescents, which can be undervalued or overvalued, and is based only on the

O grupo que utiliza mais horas diárias as RS apresentou um consumo mais frequente de *fast-food*, apesar de não ser estatisticamente significativo. Foi feito um estudo na Austrália em adolescentes que utilizam RS, que avaliou o impacto da publicidade de *fast-food* na intenção de consumo dos adolescentes. Segundo estes autores, os anúncios de *fast-food* parecem influenciar e aumentar a probabilidade de ingestão deste tipo de alimentos (16). Por outro lado, numa revisão recente com base em estudos realizados entre 2017 e 2022, foi referido que os anúncios de alimentos nas redes sociais centram-se frequentemente na promoção do consumo de alimentos e bebidas não saudáveis, e que este facto está associado ao aumento do consumo entre os adolescentes (17). Isto poderá justificar este consumo, uma vez que os indivíduos que estão mais tempo nas RS estão mais expostos a publicidade.

A maioria dos adolescentes que segue contas relacionadas com alimentação nas RS afirmaram que as mesmas têm impacto no aumento do consumo de alimentos saudáveis e elaboração de receitas. De acordo com um estudo desenvolvido também em Lisboa, o mesmo se verificou, sendo que as contas das quais experimentam mais receitas são de nutricionistas (12). Num outro estudo em adolescentes e jovens adultos gregos, também se verificou que são inspiradoras as publicações sobre alimentação saudável e novas receitas e que, embora as imagens de alimentos apelativos, mas menos nutritivos, pareçam criar a necessidade de os participantes consumirem esses alimentos, a maioria acabou por não o fazer (18).

Dos adolescentes que seguiam contas relacionadas com alimentação nas RS, a maioria afirmou seguir maioritariamente *influencers*, sendo esse valor superior no grupo de jovens que utiliza mais de 4 horas diárias as RS, apesar de não apresentar significância estatística. Segundo Kucharczuk, a presença de *influencers* e figuras públicas em campanhas publicitárias de alimentos e bebidas nas suas RS influencia os adolescentes, sobretudo no consumo de alimentos não saudáveis. (5). Assim, o grupo que utiliza mais horas RS parece estar mais exposto a este tipo de tentação.

Quando questionados se consideravam que as RS influenciavam as suas escolhas alimentares, as respostas ficaram divididas entre "Sim" e "Não". Contudo, num estudo desenvolvido no Porto em 2018, também numa amostra de adolescentes, foi colocada exatamente a mesma questão e a maioria (60,00%) respondeu "Sim", assumindo que as RS influenciavam as suas escolhas alimentares (14). A

opinion of young people who may unconsciously be influenced by marketing strategies and cannot identify it (7).

This study has some limitations, namely the fact that the questionnaire is not validated, it is a cross-sectional study, the sample size is small and the sample is very homogeneous, since data were collected in only one school, with homogeneity in demographic, socio-economic and lifestyle issues, which may have biased the results.

However, this study also has strengths, such as the fact that it was the first study in Portugal to assess the relationship of SNs on food choice in a sample of adolescents aged between 16 and 19 years old, according to the time of SN use.

This study may be useful for future meta-analysis and development of studies on the topic, containing a more representative and heterogeneous sample, in order to reach a conclusion with statistical significance.

As future prospects, it will first be essential to study how adolescents behave in SNs and how these may impact their diet. Health professionals, in this case nutritionists, may then develop strategies for food education in the digital environment, since this environment tends to grow in future generations.

## Conclusions

With this study, it was possible to conclude that there were no differences in food choices between adolescents who use SNs less than four hours and those who use more than four hours daily. The possibility is thus assumed that there is no relationship between the time of SN use and the adolescents' food choices.

Thus, further studies on this topic, containing a more quantitatively representative and heterogeneous sample, will be necessary to strengthen the conclusions of this study.

resposta a esta questão é apenas uma autopercepção dos adolescentes, que pode ser subvalorizada ou sobrevalorizada. Passa apenas pela opinião dos jovens que, inconscientemente, podem ser influenciados por estratégias de marketing e não terem capacidade para identificar (7).

Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto de o questionário não ser validado, ser um estudo transversal, o tamanho da amostra ser reduzido e a amostra ser muito homogénea, uma vez que os dados foram recolhidos em apenas uma escola, havendo homogeneidade em questões demográficas, socioeconómicas e de estilo de vida, o que poderá ter enviesado os resultados.

Contudo, este estudo também apresenta pontos fortes como o facto de ter sido o primeiro estudo em Portugal a avaliar a relação das RS na escolha alimentar de uma amostra de adolescentes entre os 16 e 19 anos de idade, em função do tempo de utilização de RS.

O presente estudo poderá ser útil para futuras meta-análises e desenvolvimento de estudos sobre o tema, contendo uma amostra mais representativa e heterogénea, de modo a chegar-se a uma conclusão com significância estatística.

Como perspetivas futuras, primeiramente será fundamental estudar a forma como os adolescentes se comportam nas RS e de que forma estas poderão impactar na sua alimentação. De seguida, os profissionais de saúde, neste caso nutricionistas, poderão desenvolver estratégias de educação alimentar no meio digital, uma vez que este meio tende a crescer nas futuras gerações.

## Conclusões

Com este estudo foi possível concluir que não houve diferenças nas escolhas alimentares entre os adolescentes que utilizam RS menos de quatro horas e os que utilizam mais de quatro horas diárias. Assume-se assim a possibilidade de não existir relação entre o tempo de utilização de RS e as escolhas alimentares dos adolescentes.

Deste modo, serão necessários mais estudos sobre este tema, contendo uma amostra mais representativa quantitativamente e mais heterogénea, de modo a fortalecer as conclusões deste trabalho.



### **Authors' Contributions**

A.C.A.: conceptualisation and design of the study; implementation; data analysis; tables; writing. B.S.: editing and revision; supervision and final drafting.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Escola Secundária de Caneças for the opportunity and prompt availability to carry out this study and the students who participated in this study.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Contribuição de Autores**

A.C.A.: conceptualização e conceção do estudo; implementação; análise de dados; tabelas; escrita. B.S.: edição e revisão; supervisão e redação final.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Escola Secundária de Caneças pela oportunidade e pronta disponibilidade para a realização deste trabalho e aos alunos que participaram neste estudo.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## References / Referências

1. Direção-Geral de Saúde (2013). Programa Nacional de Saúde Infantil e Juvenil. Disponível em: <https://www.dgs.pt/pns-e-programas/programas-de-saude/saude-infantil-e-juvenil.aspx>.
2. Jaworska, N., & MacQueen, G. (2015). Adolescence as a unique developmental period. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 40(5), 291–293. <https://doi.org/10.1503/jpn.150268>
3. Neumark-Sztainer, D., Story, M., Perry, C., & Casey, M. A. (1999). Factors influencing food choices of adolescents: findings from focus-group discussions with adolescents. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(8), 929–937. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00222-9](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00222-9)
4. Orben A. (2020). Teenagers, screens and social media: a narrative review of reviews and key studies. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*, 55(4), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s00127-019-01825-4>
5. Kucharczuk, A. J., Oliver, T. L., & Dowdell, E. B. (2022). Social media's influence on adolescents' food choices: A mixed studies systematic literature review. *Appetite*, 168, 105765. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105765>
6. Chung, A., Vieira, D., Donley, T., Tan, N., Jean-Louis, G., Kiely Gouley, K., & Seixas, A. (2021). Adolescent Peer Influence on Eating Behaviors via Social Media: Scoping Review. *Journal of medical Internet research*, 23(6), e19697. <https://doi.org/10.2196/19697>
7. Qutteina, Y., Hallez, L., Mennes, N., De Backer, C., & Smits, T. (2019). What Do Adolescents See on Social Media? A Diary Study of Food Marketing Images on Social Media. *Frontiers in psychology*, 10, 2637. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02637>
8. Hawkins, L, Farrow, C & Thomas, J (2021). Does exposure to socially endorsed food images on social media influence food intake?, *Appetite*, 165, 105424. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105424>
9. Chau, M. M., Burgermaster, M., & Mamykina, L. (2018). The use of social media in nutrition interventions for adolescents and young adults-A systematic review. *International journal of medical informatics*, 120, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijmedinf.2018.10.001>
10. Reid Chassiakos, Y. L., Radesky, J., Christakis, D., Moreno, M. A., Cross, C., & Council on Communications and Media (2016). Children and Adolescents and Digital Media. *Pediatrics*, 138(5), e20162593. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-2593>
11. Plaisime, M., Robertson-James, C., Mejia, L., Núñez, A., Wolf, J., & Reels, S. (2020). Social Media and Teens: A Needs Assessment Exploring the Potential Role of Social Media in Promoting Health. *Social Media + Society*. <https://doi.org/10.1177/2056305119886025>
12. Silva, A. S. (2021). A influência do instagram nas escolhas alimentares. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Publicidade e Marketing, orientada por Carla Medeiros, Lisboa.
13. Moorhead, SA, Hazlett, DE, Harrison, L, Carroll, JK, Irwin, A., & Hoving, C. (2013). A new dimension of health care: systematic review of the uses, benefits, and limitations of social media for health communication. *Journal of medical Internet research*, 15 (4), e85. <https://doi.org/10.2196/jmir.1933>
14. Ribeiro, P. (2018). Influência das redes sociais nos hábitos alimentares dos adolescentes. Trabalho de investigação, orientado por Sandra Faria, Porto.
15. Starri, M. (2021). We Are Social. Digital 2021: I Dati Globali. <https://wearesocial.com/it/blog/2021/01/digital-2021-i-dati-globali/>
16. Thaichon, P, & Quach, TN (2016). Online marketing communications and childhood's intention to consume unhealthy food. *Australian Marketing Journal*, 24 (1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ausmj.2016.01.007>
17. Tsochantaridou, A., Sergeantanis, T. N., Grammatikopoulou, M. G., Merakou, K., Vassilakou, T., & Kornarou, E. (2023). Food Advertisement and Dietary Choices in Adolescents: An Overview of Recent Studies. *Children*, 10(3), 442. <http://doi.org/10.3390/children10030442>
18. Stamatiou, R., Katsafadou, V., Mouratidou, T. (2022). The impact of social media on dietary choices, emotions around food consumption and body image in Greek adolescents and young adults. *Public Health and Toxicology*, 2(Supplement 1), A152. <https://doi.org/10.18332/pht/149841>

## Methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves reduced serum creatinine level and prevented the elevation of hepatic enzymes in mice exposed to gentamicin and acetaminophen: an exploratory study

### O extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* reduziu o nível de creatinina sérica e impediu a elevação das enzimas hepáticas em ratinho expostos a gentamicina e acetaminofeno: um estudo exploratório

Sebastián Funes-Rivera <sup>1,2</sup> , María L. Kennedy <sup>1</sup> , Antonia K. Galeano <sup>1</sup> , Patricia M. Funes Torres <sup>2</sup> , Miguel A. Campuzano-Bublitz <sup>1</sup>  

**Keywords:** *Bauhinia forficata*, silymarin, creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase

**Palavras-chave:** *Bauhinia forficata*, silimarina, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina

#### To Cite:

Funes-Rivera, S. F., Kennedy, M. L., Galeano, A. K., Funes Torres, P. M. & Campuzano-Bublitz, M. A. (2023) Methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves reduced serum creatinine level and prevented the elevation of hepatic enzymes in mice exposed to gentamicin and acetaminophen: an exploratory study. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 64-82.

 [10.19277/bbr.20.1.311](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.311)

1 - Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169. San Lorenzo. Paraguay

2 - Departamento de Bioquímica Clínica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169. San Lorenzo. Paraguay

Correspondence to / Correspondência a:  
[mbublitz@qui.una.py](mailto:mbublitz@qui.una.py)

Received / Recebido: 17/04/2023  
Accepted / Aceite: 22/06/2023

#### Abstract

Kidney and liver diseases are a public health problem worldwide. Pharmacological management usually prevents its progress even if indirectly. Currently, more alternative treatments based on traditional medicine and medicinal plants are considered. *Bauhinia forficata* is widely distributed in South America and is used for its hepatoprotective and nephroprotective properties. This study was designed to preliminarily assess the nephroprotective and hepatoprotective effect of the methanol extract of *B. forficata* leaves (50, 100, 200, and 400 mg/kg, per os) in Swiss albino mice. Acute kidney injury was induced with gentamicin (135 mg/kg, intraperitoneal), followed by determination of creatinine, urea, uric acid, and electrolyte levels in urine and serum. Acute liver damage was induced by acetaminophen (300 mg/kg, intraperitoneal), followed by determination of a serum liver profile of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase. All tested doses of the extract were able to induce a significant reduction in serum creatinine levels, compared to untreated animals. Moreover, the extract effectively prevented the elevation of hepatic enzyme activity induced by acetaminophen. It is concluded that the extract of *B. forficata* leaves has nephroprotective and hepatoprotective effects in a mouse model of hepato and nephrotoxicity, which is compatible with traditional use.

#### Resumo

As doenças renais e hepáticas são um problema global de saúde pública. A gestão farmacológica impede geralmente a sua progressão. Atualmente, são desenvolvidos tratamentos alternativos baseados na medicina tradicional e na utilização de plantas medicinais. A *Bauhinia forficata* está amplamente distribuída na América do Sul e é utilizada pelas suas propriedades hepatoprotectoras e nefroprotectoras. Este estudo foi concebido para avaliar preliminarmente estes efeitos das folhas de *B. forficata* (50, 100, 200 e 400 mg/kg, per os) em ratinhos. A lesão renal aguda foi induzida com gentamicina (135mg/kg, intraperitoneal), seguida da determinação dos níveis de creatinina, ureia, ácido úrico e electrólitos na urina e no soro. A lesão hepática aguda foi induzida por acetaminofeno (300 mg/kg, intraperitoneal), seguida da determinação de um perfil hepático sérico de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Todas as doses testadas induziram uma redução significativa dos níveis séricos de creatinina, em comparação com os animais não tratados. Além disso, o extrato impediu eficazmente a elevação da atividade das enzimas hepáticas induzida pela acetaminofeno. Conclui-se que o extrato das folhas de *B. forficata* tem efeitos nefroprotectores e hepatoprotectores num modelo de ratinho de hepato e nefrotoxicidade, o que é compatível com a utilização tradicional.

## Introduction

The kidneys and liver are organs closely related to substance metabolism and detoxification. Stress situations, such as metabolic overload or frequent exposure to harmful agents, particularly the action of xenobiotics, compromise their proper function (1, 2). Few therapeutic resources are available, so the study of alternative medications to preserve the functionality of these organs is very important (3).

The etiology of kidney disease is variable; some are specific to the individual according to physiological factors; others are related to underlying pathologies, such as diabetes or high blood pressure, or are due to direct factors such as nephrotoxic compounds. Among these, the main compounds are aminoglycoside antibiotics (2). Kidney disease is among the first ten leading causes of death worldwide, regardless of race, sex, age, or geographical location. In our country, Paraguay, a total of 366 patients required hemodialysis in 2010. In 2019, the total number of dialyzed patients increased to 1638, of which 61% were men (4). Worldwide, 5 million people die annually from lack of access to critical treatments for kidney disease. It is projected that chronic kidney disease will soon be the fifth leading cause of death. Generally, with limited epidemiological data, limited knowledge, and poor access to laboratory services, the true burden of kidney disease is underestimated. Kidney diseases are pathologically diverse and are often asymptomatic. As such, it is often diagnosed late, and patient care requires specialized resources that increase healthcare costs. Prevention of kidney disease is highly cost-effective but requires a multisectoral holistic approach (5).

The liver is a critical organ in the human body, responsible for various functions, such as bile secretion. It is also related to the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins, the processing of drugs and hormones, and the detoxification of substances such as alcohol, drugs and hormones through a process called biotransformation (6). Liver disease is multifactorial, and may be the result of metabolic imbalances, such as alpha-1-antitrypsin

## Introdução

Os rins e o fígado são órgãos intimamente relacionados com o metabolismo e a desintoxicação das substâncias. Situações de stress, como a sobrecarga metabólica ou a exposição frequente a agentes nocivos, nomeadamente a ação de xenobióticos, comprometem o seu bom funcionamento (1, 2). Os recursos terapêuticos disponíveis são escassos, pelo que é muito importante o estudo de medicamentos alternativos destinados a preservar a funcionalidade destes órgãos (3).

A etiologia da doença renal é variável. Algumas são específicas do indivíduo, de acordo com factores fisiológicos, outras estão relacionadas com patologias subjacentes, como a diabetes ou a hipertensão arterial, ou devem-se a factores directos, como compostos nefrotóxicos como é o caso dos antibióticos aminoglicosídeos (2). A doença renal está já entre as dez primeiras causas de morte em todo o mundo, independentemente da raça, sexo, idade ou localização geográfica. No nosso País, o Paraguai, um total de 366 pacientes necessitaram de hemodiálise em 2010. Em 2019, o número total de pacientes dialisados aumentou para 1638, dos quais 61% eram homens (4). Em todo o mundo, 5 milhões de pessoas morrem anualmente devido à falta de acesso a tratamentos críticos para a doença renal (4). Prevê-se que a doença renal crónica venha em breve a ser a quinta principal causa de morte. Geralmente, com dados epidemiológicos limitados, conhecimentos reduzidos e acesso deficiente a serviços laboratoriais, o verdadeiro ónus da doença renal é subestimado. As doenças renais são patologicamente diversas e são frequentemente assintomáticas. Como tal, são frequentemente diagnosticadas tardiamente e os cuidados prestados aos doentes exigem recursos especializados que aumentam os custos dos cuidados de saúde. A prevenção da doença renal é altamente rentável, mas exige uma abordagem holística multisectorial (5).

O fígado é um órgão crítico do corpo humano, responsável por várias funções, como a secreção de bÍlis. Está também relacionado com o metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, com o processamento de fármacos e hormonas e com a desintoxicação de substâncias como o álcool, fármacos e hormonas através de um processo denominado biotransformação (6). A doença hepática é multifatorial, podendo resultar de desequilíbrios metabólicos, como a deficiência de alfa-1-antitripsina, hemocromatose (doença de

deficiency, hemochromatosis (Wilson's disease), obesity, accumulation of drugs such as paracetamol or other xenobiotics in the body, or due to viruses. Thus, it is a disease that can occur in individuals of all ages. One of the main chronic liver diseases worldwide is cirrhosis, derived from obesity or long-term abuse of alcoholic beverages, which mainly affects individuals between 60 and 80 years of age (7). Liver disease accounts for over 2 million deaths annually (cirrhosis, viral hepatitis, and liver cancer), 4% of all deaths. Currently, liver disease is the 11th leading cause of death, but liver deaths may be underestimated (7).

Current pharmacological treatments mainly treat these conditions indirectly, reducing the factors that can lead to more significant complications, with certain side effects and high costs. Silymarin is a mixture of flavonolignans extracted from the seeds of *Silybum marianum* used since ancient times to treat chronic and acute liver conditions. It has been shown to prevent liver damage caused by various toxins, with its effects frequently attributed to its antioxidant, free radical scavenging, and iron chelating properties (8).

Several plants have shown their nephroprotective properties in experimental studies in animal models, among them *Phyllanthus amarus* (9), green tea (10), and *Eclipta alba* (11). Likewise, the aqueous extract of the bark of *Bauhinia variegata* demonstrated protective effects against liver failure and nephrotoxicity caused by thioacetamide in rats (12) and those with liver damage caused by carbon tetrachloride (13). *Smallanthus sonchifolius* reversed acetaminophen-induced liver damage in rats (14) and *Opuntia ficus-indica* cladodes extract prevented lithium-induced liver injury (15). In previous works, we have demonstrated the hepato- and nephroprotective property of *Prosopis ruscifolia* (16), *Baccharis crispa* (17), and *Dorstenia brasiliensis* (18) in mice.

*Bauhinia forficata* (Fabaceae) is an arboreal species whose leaves are used in infusion to treat kidney and liver conditions and as a hypoglycemic agent. In Brazil, it is used as a hypolipidemic, diuretic, expectorant, tonic, carminative, and digestive, among other uses (19). It is also used topically as an astringent to treat wounds or canker sores.

Wilson), obesidade, acumulação de fármacos como o paracetamol ou outros xenobióticos no organismo, ou devido a vírus. Assim, é uma doença que pode ocorrer em indivíduos de todas as idades. Uma das principais doenças crônicas do fígado a nível mundial é a cirrose, resultando da obesidade ou do abuso prolongado de bebidas alcoólicas, que afecta principalmente indivíduos entre os 60 e os 80 anos de idade (7). As doenças hepáticas são responsáveis por mais de 2 milhões de mortes (cirrose, hepatite viral e cancro do fígado), ou seja, 4% de todas as mortes. Atualmente, a doença hepática é a 11.<sup>a</sup> principal causa de morte, mas as mortes por doença hepática podem estar subestimadas (7).

Os tratamentos farmacológicos actuais tratam principalmente estas condições de forma indireta, reduzindo os factores que podem levar a complicações mais significativas, com determinados efeitos secundários e custos elevados. A silimarina é uma mistura de flavonolignanós extraída das sementes de *Silybum marianum* utilizada desde a antiguidade para tratar afecções hepáticas crónicas e agudas. Foi demonstrado que previne as lesões hepáticas causadas por várias toxinas, sendo os seus efeitos frequentemente atribuídos às suas propriedades antioxidantes, de eliminação de radicais livres e de quelação do ferro (8).

Várias plantas demonstraram as suas propriedades nefroprotectoras em estudos experimentais em modelos animais, entre elas o *Phyllanthus amarus* (9), o chá verde (10) e a *Eclipta alba* (11). Da mesma forma, o extrato aquoso da casca de *Bauhinia variegata* demonstrou efeitos protectores contra a insuficiência hepática e a nefrotoxicidade causada pela tioacetamida em ratinhos (12) e em ratinhos com lesões hepáticas causadas pelo tetracloreto de carbono (13). A *Smallanthus sonchifolius* inverteu as lesões hepáticas induzidas pelo acetaminofeno em ratinhos (14) e o extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* preveniu as lesões hepáticas induzidas pelo lítio (15). Em trabalhos anteriores, demonstrámos as propriedades hepato- e nefroprotectora da *Prosopis ruscifolia* (16), *Baccharis crispa* (17), e *Dorstenia brasiliensis* (18) em ratinhos.

A *Bauhinia forficata* (Fabaceae) é uma espécie arbórea cujas folhas são utilizadas em infusão para tratar afecções renais e hepáticas e como agente hipoglicémico. No Brasil, é utilizada como hipolipidémico, diurético, expetorante, tónico, carminativo e digestivo, entre outros usos (19). Também é usado topicamente como adstringente para tratar feridas ou aftas.

The methanol extract of *B. forficata* showed good antioxidant and hypoglycemic activities (19). Based on its terpenoid composition, its antibacterial and fungicidal activity has been verified. The traditional medicinal use of the infusion of *B. forficata* leaves has not reported cases of toxic adverse effects (19), although *in vitro* studies have shown that depending on the dose, mitochondrial damage, as well as mutagenic activities and thyroid dysfunction, can occur (20, 21).

The main constituents of *B. forficata* in leaves are phenolic compounds, particularly flavonoids, together with terpenes and steroids. The flavonoids are principally kaempferol and quercetin derivatives. Some phenolic compounds, including gallic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid, were also identified (19, 22).

The use of natural therapies for several diseases has a long history, and *B. forficata* has been traditionally used to treat liver and kidney conditions. The current work aimed to evaluate the nephroprotective and hepatoprotective potential of *Bauhinia forficata* leaf extract. Nephroprotection was analyzed by determining classic renal profiles as well as urinary and renal electrolyte profiles. The hepatoprotective effect was evaluated via the hepatic profiling. Considering the importance of kidney and liver-associated health conditions, the potential protective effect in mice using methanol extract from this natural resource is reported here for the first time. The extract was able to attenuate chemically induced kidney and liver damage in mice evidenced by reduced serum creatinine levels and prevention of elevated hepatic enzyme activity.

O extrato metanólico de *B. forficata* mostrou boas atividades antioxidantes e hipoglicêmicas (19). Com base na sua composição de terpenóides, foi verificada a sua atividade antibacteriana e fungicida. A utilização medicinal tradicional da infusão das folhas de *B. forficata* não tem registado casos de efeitos adversos tóxicos (19), embora estudos *in vitro* tenham demonstrado que, dependendo da dose, podem ocorrer danos mitocondriais, bem como atividades mutagénicas e disfunção da tiroide (20, 21).

Os principais constituintes de *B. forficata* nas folhas são compostos fenólicos, particularmente flavonóides, juntamente com terpenos e esteróides. Os flavonóides são principalmente derivados do kaempferol e da quercetina. Foram também identificados alguns compostos fenólicos, incluindo o ácido gálico, o ácido clorogénico e o ácido cafeico (19, 22).

O uso de terapias naturais para várias doenças tem uma longa história, e a *B. forficata* tem sido tradicionalmente usada para tratar doenças do fígado e dos rins. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial nefroprotector e hepatoprotector do extrato de folhas de *Bauhinia forficata*. A nefroprotecção foi analisada através da determinação dos perfis renais clássicos, bem como dos perfis urinário e eletrolítico renal. O efeito hepatoprotector foi avaliado através do perfil hepático. Considerando a importância das condições de saúde associadas aos rins e ao fígado, o potencial efeito protetor em ratinhos utilizando o extrato de metanol deste recurso natural é aqui relatado pela primeira vez. O extrato foi capaz de atenuar as lesões renais e hepáticas induzidas quimicamente em ratinhos, evidenciadas pela redução dos níveis de creatinina sérica e pela prevenção da atividade elevada das enzimas hepáticas.

## Material and Methods

### *Plant material and extract preparation*

The leaves of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) were collected from the city of Itá, Central Department, Paraguay. The plant material was identified by researchers from the Department of Botany. A pressed and dried specimen is filed in the herbarium of the Facultad de Ciencias Químicas of Universidad Nacional de Asunción (FCQ-UNA), under the Code: Degen, González et González 4045. The extract of *B. forficata* was obtained by sonicating the dried and ground leaves in methanol (x3). The solvent was removed under reduced pressure on a rotary evaporator. The resulting extract was stored in a desiccator until used in biological assays. For this purpose, the extract was dissolved in water.

### *Reagents and equipment*

Gentamicin (Larjan, Veinfar, Argentina), acetaminophen (Sigma, St. Louis, MO, USA) mosilymarin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and sodium pentobarbital from Abbott (Japan) were used. Methanol was purchased locally and distilled before use. The estimations of parameters of hepatic and kidney functionality were made with equipment (Autoanalyzer CB350i) and kits purchased from Wiener Lab (Rome, Italy). Electrolyte determinations were made with equipment (Combi-line) and reagents from Eschweiler (Kiel, Germany). A Hermle Z216M microcentrifuge was used (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Metabolic cages were purchased from Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co. Ltd (Suzhou City, China). Normal and pathological human serum (Humatrol, Wiesbaden-Germany) were used as quality controls.

### *Experimental animals and ethical issues*

Toxicity tests were performed with female mice. Nephro- and hepatoprotection experiments were performed in adult (12 weeks old) male Swiss albino mice weighing  $30 \pm 5$  g, apparently healthy, procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas, kept in standard laboratory conditions (acclimated to a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and humidity of up to 60%, in rooms with 12/12h light/darkness cycles). The animals were fed daily (6 g/animal) and received water *ad libitum* throughout the experiment. For animal handling, the standards established by the Ethics Commission of the European Community were followed (23). The project protocol was approved by the Research Ethics Committee of the FCQ (Comité

## Material e Métodos

### *Material vegetal e preparação do extrato*

As folhas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) foram coletadas na cidade de Itá, Departamento Central, no Paraguai. O material vegetal foi identificado por pesquisadores do Departamento de Botânica. Um espécime prensado e seco está arquivado no herbário da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Asunción (FCQ-UNA), sob o código: Degen, González et González 4045. O extrato de *B. forficata* foi obtido por sonicação das folhas secas e moídas em metanol (x3). O solvente foi removido sob pressão reduzida num evaporador rotativo. O extrato resultante foi armazenado num exsiccador até ser utilizado nos ensaios biológicos. Para este efeito, o extrato foi dissolvido em água.

### *Reagentes e equipamento*

Foram utilizados gentamicina (Larjan, Veinfar, Argentina), acetaminofeno (Sigma, St. Louis, MO, EUA), mosilymarin (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e pentobarbital sódico (Abbott, Japão). O metanol foi adquirido localmente e destilado antes da utilização. As estimativas dos parâmetros de funcionalidade hepática e renal foram efectuadas com equipamento (Autoanalyzer CB350i) e kits adquiridos ao Wiener Lab (Roma, Itália). As determinações de electrólitos foram feitas com equipamento (Combi-line) e reagentes de Eschweiler (Kiel, Alemanha). Foi utilizada uma microcentrifugadora Hermle Z216M (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha). As gaiolas metabólicas foram adquiridas à Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co. Ltd (Suzhou City, China). Foram utilizados soros humanos normais e patológicos (Humatrol, Wiesbaden-Alemanha) como controlos de qualidade.

### *Animais de laboratório e questões éticas*

Os testes de toxicidade foram efectuados em ratinhos fêmeas. As experiências de nefro e hepatoprotecção foram realizadas em ratinhos albinos suíços machos adultos (12 semanas de idade), pesando  $30 \pm 5$  g, aparentemente saudáveis, adquiridos no biotério da Facultad de Ciencias Químicas, mantidos em condições laboratoriais normais (aclimatados a uma temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e humidade até 60%, em salas com ciclos de 12/12h de luz/escurecimento). Os animais foram alimentados diariamente (6 g/animal) e receberam água *ad libitum* durante todo o experimento. Para a manipulação dos animais, foram seguidas as normas estabelecidas pela Comissão de

de Ética en Investigación, CEI 471/19). The animals were used only once, and for their final disposal, they were delivered to a company specialized in biological waste management.

#### *Acute oral toxicity test*

Toxicity test guidelines in protocol number 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) were followed. A group of five female mice received orally, cumulatively, every 24 hours, doses of 5 up to 2000 mg/kg of extract and were compared with a control group (n=5, distilled water). The animals were observed up to 8 hours after each treatment and subsequently for a period of 15 days. The presence of signs of toxicity, as well as their severity, progression, and reversibility, were sought and recorded in relation to dose and time. At the end of the observation period, the main organs were macroscopically examined (24).

#### *Gentamicin-induced nephrotoxicity and treatments*

The doses for assessment of the nephroprotective and hepatoprotective effect in mice were selected according to the higher doses tested in acute toxicity tests. In this case, no evidence of toxicity was observed in doses lower than 2000 mg/kg. Male mice divided into seven groups (n=6) received the treatment for nine days: control (Veh; water, *per os*); gentamicin (Gent; water 0.1 mL/10g body weight, *per os*, and gentamicin); reference hepatoprotection drug silymarin (Sil; 150 mg/kg body weight, silymarin, dissolved in ethanol: propylene glycol: water 1:4:5, *per os*, and gentamicin); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (containing 50, 100, 200 and 400 mg/kg of *B. forficata* methanol extract, respectively, *per os*, and gentamicin). Except in the control group, mice received the gentamicin (135 mg/kg; intraperitoneal) one hour after the treatments. This dose was standardized in previous studies in the mice procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas. The weight of each mouse was recorded daily. On the ninth day, the mice were transferred to individual metabolic cages for 24 h to collect urine samples and quantify food consumption (16). The amount of food and the volume of water consumed during confinement in a metabolic box were also recorded. After the stay in metabolic cages, all animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and blood was collected.

Ética da Comunidade Europeia (23). O protocolo do projeto foi aprovado pelo Comité de Ética em Investigação da FCQ (Comité de Ética en Investigación, CEI 471/19). Os animais foram utilizados uma única vez e, para a sua eliminação final, foram entregues a uma empresa especializada na gestão de resíduos biológicos.

#### *Teste de toxicidade oral aguda*

Foram seguidas as directrizes para os testes de toxicidade do protocolo número 420 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Um grupo de cinco ratinhos fêmeas recebeu por via oral, cumulativamente, a cada 24 horas, doses de 5 a 2000 mg/kg de extrato e foram comparados com um grupo de controlo (n=5, água destilada). Os animais foram observados até 8 horas após cada tratamento e, posteriormente, durante um período de 15 dias. A presença de sinais de toxicidade, bem como a sua gravidade, progressão e reversibilidade, foram procuradas e registadas em função da dose e do tempo. No final do período de observação, os principais órgãos foram examinados macroscopicamente (24).

#### *Nefrotoxicidade induzida pela gentamicina e tratamentos*

As doses para avaliação do efeito nefroprotector e hepatoprotector em ratinhos foram seleccionadas de acordo com as doses mais elevadas testadas em ensaios de toxicidade aguda. Neste caso, não foi observada qualquer evidência de toxicidade em doses inferiores a 2000 mg/kg. Os ratinhos machos divididos em sete grupos (n=6) receberam o tratamento durante nove dias: controlo (Veh; água, *per os*); gentamicina (Gent; água 0.1 mL/10g de peso corporal, *per os*, e gentamicina); droga hepatoprotectora de referência silimarina (Sil; 150 mg/kg de peso corporal, silimarina, dissolvida em etanol: propilenoglicol: água 1:4:5, *per os*, e gentamicina); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (contendo 50, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato metanólico de *B. forficata*, respetivamente, *per os*, e gentamicina). Exceto no grupo de controlo, os ratinhos receberam a gentamicina (135 mg/kg; intraperitoneal) uma hora após os tratamentos. Esta dose foi padronizada em estudos anteriores nos ratinhos adquiridos no biotério da Faculdade de Ciências Químicas. O peso de cada ratinho foi registado diariamente. No nono dia, os ratinhos foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais durante 24 h para recolher amostras de urina e quantificar o consumo de alimentos (16). A quantidade de alimentos e o volume de água consumidos durante o confinamento



*Acetaminophen-induced hepatotoxicity and treatments*

Mice were divided into seven groups (n=6). They were treated for four days: control (Veh; water, *per os*); acetaminophen (APAP; water, *per os*); silymarin (Sil; 150 mg/kg of silymarin, dissolved in ethanol: propylene glycol: water 1:4:5, *per os*); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (with 50, 100, 200 and 400 mg/kg of *B. forficata* extract, respectively, *per os*). On the fourth day, two hours after the oral treatment, except animals in control group, acute hepatotoxicity was induced in mice using acetaminophen (APAP, 300 mg/kg, intraperitoneal). This dose was standardized in previous studies in the mice procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas (16). Three hours after acetaminophen administration, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and blood was collected. Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT) and alanine aminotransferase (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) were determined (16) in serum.

*Determination of biochemical parameters*

In the nephroprotective activity assay, exsanguination of mice by cardiac puncture under anesthesia was made following removal from the metabolic cages. Serum was obtained after incubation of the fresh blood for 20 min at 37°C and centrifugation for 10 minutes at 3000 rpm. The concentrations of urea, creatinine, and uric acid (mg/dL), as well as potassium and sodium (mEq/L) were determined. The volume of urine after 24 hours was measured (mL), and in this sample, the concentrations of creatinine, urea, and uric acid (mg/kg/24h), together with sodium and potassium (mEq/kg/24h) were determined. The concentration of sodium and potassium in serum and urine was determined in the Eschweiler Combi-Line electrolyte meter. The equipment was duly calibrated and accredited under internal and external quality controls prior to the determination of the analytes. The direct ion selective electrode method was used for serum determinations, referring to the determination of electrolytes in whole samples without dilution. For the determination of electrolytes in urine, the indirect ion selective electrode method was used, where the sample undergoes a dilution prior to the determination.

na caixa metabólica também foram registrados. Após a permanência nas gaiolas metabólicas, todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e recolhida amostra de sangue.

*Hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e tratamentos*

Os ratinhos foram divididos em sete grupos (n=6). Foram tratados durante quatro dias: controlo (Veh; água, *por via oral*); acetaminofeno (APAP; água, *por via oral*); silimarina (Sil; 150 mg/kg de silimarina, dissolvida em etanol: propilenoglicol: água 1:4:5, *por via oral*); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (com 50, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato de *B. forficata*, respetivamente, *por via oral*). No quarto dia, duas horas após o tratamento oral, exceto nos animais do grupo de controlo, foi induzida hepatotoxicidade aguda em ratinhos utilizando acetaminofeno (APAP, 300 mg/kg, intraperitoneal). Esta dose foi padronizada em estudos anteriores em ratinhos obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Químicas (16). Três horas após a administração de acetaminofeno, os ratinhos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e recolhida amostra de sangue. A fosfatase alcalina (ALP), a aspartato aminotransferase (transaminase glutâmico-oxaloacética, GOT) e a alanina aminotransferase (transaminase glutâmico-pirúvica, GPT) foram determinadas no soro(16).

*Determinação dos parâmetros bioquímicos*

No ensaio da atividade nefroprotectora, procedeu-se à exsanguinação dos ratinhos por punção cardíaca sob anestesia, após a remoção das gaiolas metabólicas. O soro foi obtido após incubação do sangue fresco durante 20 minutos a 37°C e centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. Foram determinadas as concentrações de ureia, creatinina e ácido úrico (mg/dL), bem como de potássio e sódio (mEq/L). Foi medido o volume de urina após 24 horas (mL) e, nesta amostra, foram determinadas as concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico (mg/kg/24h), bem como de sódio e potássio (mEq/kg/24h). A concentração de sódio e potássio no soro e na urina foi determinada no medidor de electrólitos Eschweiler Combi-Line. O equipamento foi devidamente calibrado e acreditado sob controlos de qualidade internos e externos antes da determinação dos analitos. Para as determinações no soro foi utilizado o método do elétrodo seletivo de iões direto, referente à determinação de electrólitos em amostras inteiras sem diluição. Para a determinação de electrólitos na urina, foi utilizado o método do elétrodo seletivo de iões indireto, em que a amostra é submetida a uma diluição antes da determinação.

In the hepatoprotective activity assay, GOT, GPT, and ALP were determined. Serum was obtained after incubating the fresh blood and then centrifuged. Internal quality control made using normal and pathological control serum. The activities of GOT, GPT and ALP were determined in a spectrophotometer at 340nm, and the results expressed in U/L (25, 26).

#### *Statistical analysis*

The results correspond to mean  $\pm$  standard deviation (SD),  $p < 0.05$  was considered statistically significant. One way ANOVA, and Dunnett's test was done using the GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., CA).

## **Results**

Toxicity test results indicated that the methanol extract of *Bauhinia forficata* did not show a toxic effect during the observation period. No mortality was observed. No macroscopic differences or evidence of damage were observed between the organs (liver, lung, pancreas, heart, kidney) of animals in the control group and those treated with extract. The behavior of the animals was not altered. Moreover, water and food consumption in the treated and control groups were similar. Taken together these results indicate that the extract is safe up to 2000 mg/kg after oral administration (data not shown).

#### *Determination of the nephroprotective effect*

Male mice with kidney damage induced by gentamicin were used. The main marker of acute kidney injury is elevated serum creatinine concentration. After nine days, a statistically significant difference (Gent group 40% more than Veh,  $< 0.01$ ) was observed between control (Veh) and pathological groups (Gent), validating this model to identify plant extracts with nephroprotective activity. A mild protective effect was observed in the group treated with silymarin, since serum creatinine level in this group was lower than in pathological group, but this difference was not significant. All tested doses of the extract significantly reduced the serum creatinine level (Bf 50 (78%) and Bf 100 (77%):  $p < 0.05$ ; Bf 200 (63%):  $p < 0.001$ ; Bf 400 (71%):  $p < 0.01$ ; Figure 1 A), compared to Gent group. Urinary creatinine levels were not different, although the level in all groups treated with silymarin and the

No ensaio de atividade hepatoprotectora, foram determinadas a GOT, a GPT e a ALP. O soro foi obtido após incubação do sangue fresco e depois centrifugado. O controlo de qualidade interno foi efectuado utilizando soro de controlo normal e patológico. As actividades de GOT, GPT e ALP foram determinadas num espectrofotómetro a 340 nm, e os resultados expressos em U/L (25, 26).

#### *Análise estatística*

Os resultados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (DP) considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. A ANOVA de uma via e o teste de Dunnett foram efectuados utilizando o GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., CA).

## **Resultados**

Os resultados dos testes de toxicidade indicaram que o extrato metanólico de *Bauhinia forficata* não apresentou um efeito tóxico durante o período de observação. Não foi observada qualquer mortalidade. Não foram observadas diferenças macroscópicas ou evidências de danos entre os órgãos (fígado, pulmão, pâncreas, coração, rim) dos animais do grupo de controlo e dos animais tratados com o extrato. O comportamento dos animais não foi alterado. Além disso, o consumo de água e de alimentos nos grupos tratados e de controlo foi semelhante. Em conjunto, estes resultados indicam que o extrato é seguro até 2000 mg/kg após administração oral (dados não mostrados).

#### *Determinação do efeito nefroprotector*

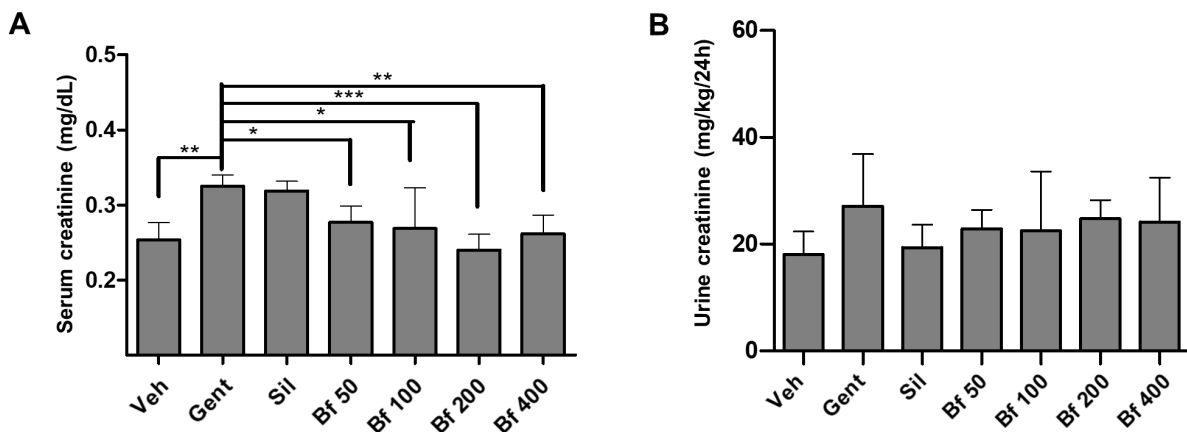
Foram utilizados ratinhos machos com lesões renais induzidas pela gentamicina. O principal marcador de lesão renal aguda foi a elevada concentração de creatinina no soro. Após nove dias, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de controlo (Veh) e patológico (Gent) (grupo Gent 40% mais do que Veh,  $< 0,01$ ), validando este modelo para identificar extractos de plantas com atividade nefroprotectora. Foi observado um efeito protetor ligeiro no grupo tratado com silimarina, uma vez que o nível de creatinina sérica neste grupo foi inferior ao do grupo patológico, mas esta diferença não foi significativa. Todas as doses testadas do extrato reduziram significativamente o nível de creatinina sérica (Bf 50 (78%) e Bf 100 (77%):  $p < 0,05$ ; Bf 200 (63%):  $p < 0,001$ ; Bf 400 (71%):  $p < 0,01$ ; Figura 1 A), em comparação com o grupo Gent. Os níveis de creatinina urinária não foram diferentes, embora os níveis em todos os grupos tratados com silimarina

extract, were comparable to the value in control group and lower than the pathological group (Figure 1 B).

Serum and urinary urea levels (Figures 2 A and B) were not altered after the treatment with *B. forficata*, when compared with the Gent group. Although serum urea levels showed a reduction in animals treated with all doses of the extract, this difference was not significant (Figure 2 A).

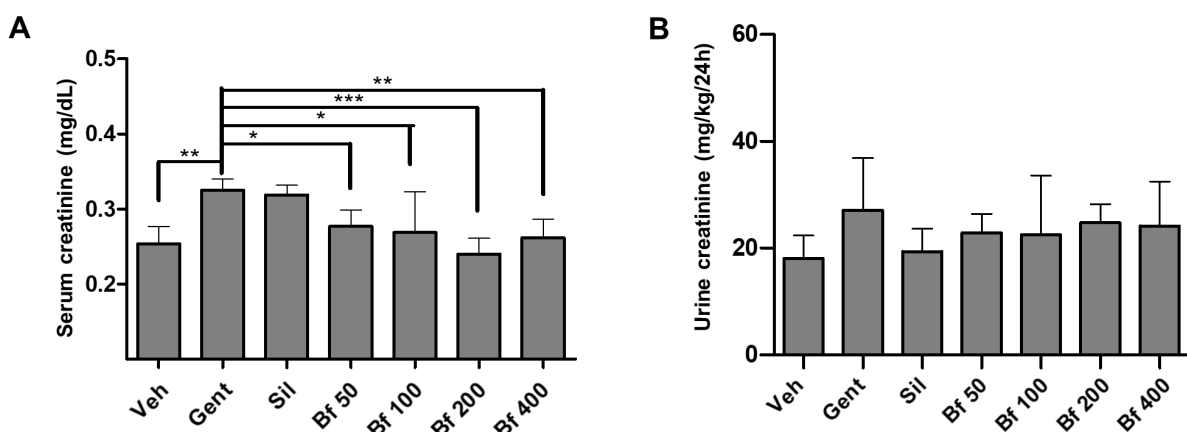
e extrato fossem comparáveis ao valor do grupo de controlo e inferiores aos do grupo patológico (Figura 1 B).

Os níveis séricos e urinários de ureia (Figuras 2 A e B) não foram alterados após o tratamento com *B. forficata*, quando comparados com o grupo Gent. Embora os níveis séricos de ureia tenham apresentado uma redução nos animais tratados com todas as doses do extrato, esta diferença não foi significativa (Figura 2 A).



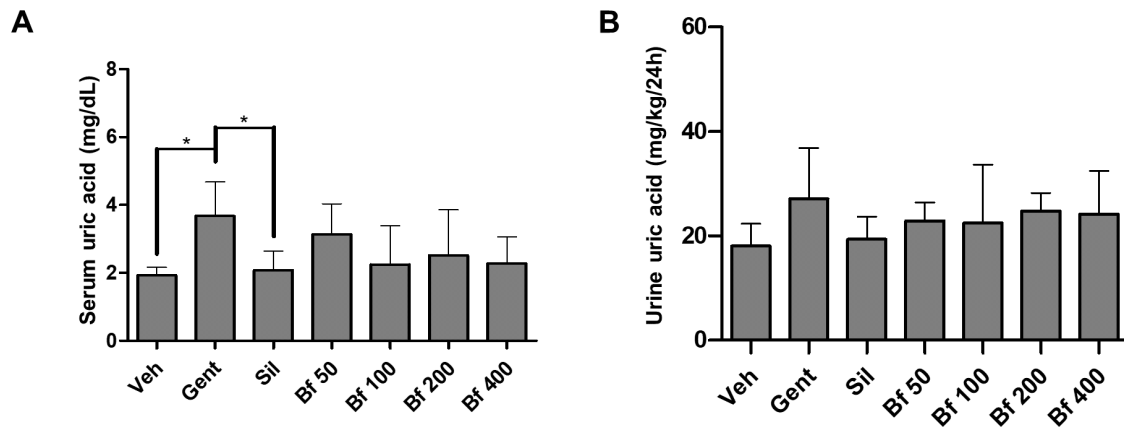
**Figure 1** - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of creatinine in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 significantly different from Gent).

**Figura 1** - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de creatinina no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 significativamente diferente de Gent).



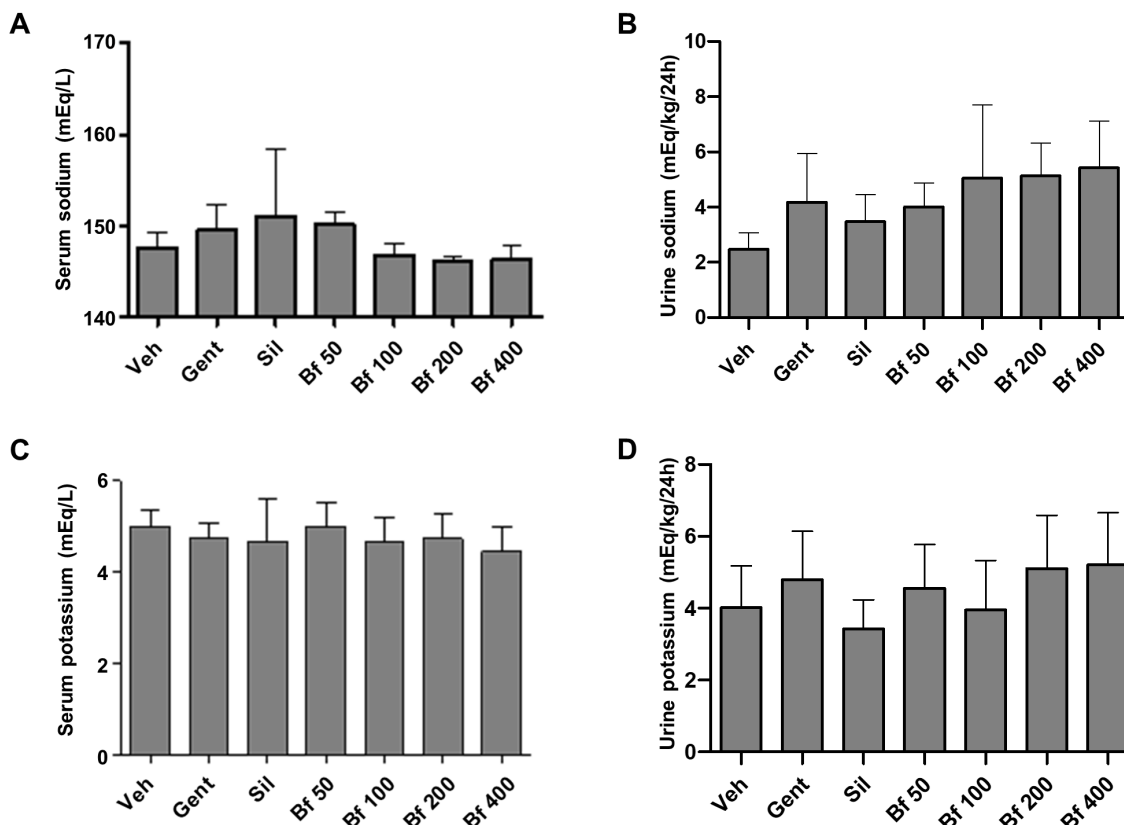
**Figure 2** - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of urea in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. \* p<0.05 significantly different from Gent.

**Figura 2** - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de ureia no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. \* p<0,05 significativamente diferente de Gent.



**Figure 3** - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of uric acid in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. \*  $p < 0.05$  significantly different from Gent.

**Figura 3** - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de ácido úrico no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente de Gent.



**Figure 4** - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of sodium in serum (A) and urine (B), and of potassium in serum (C) and urine (D), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. \*  $p < 0.05$  significantly different from Gent.

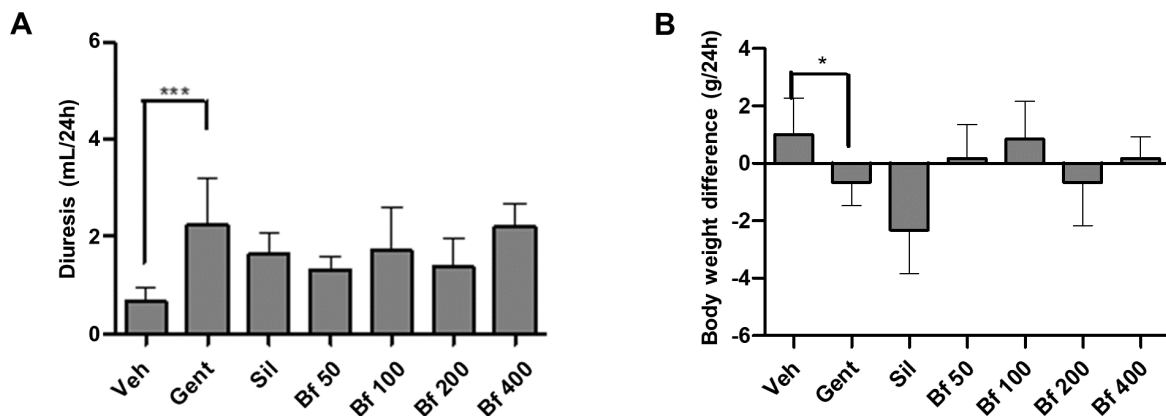
**Figura 4** - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de sódio no soro (A) e na urina (B) e de potássio no soro (C) e na urina (D), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente de Gent.

Pathological group (Gent) serum uric acid concentration was significantly higher compared to the control (86%,  $p < 0.05$ ), and silymarin (64%,  $p < 0.05$ ). Animals treated with the extract (50, 100, 200 and 400 mg/kg), exhibited lower concentrations than the Gent group and were closer to the silymarin (Sil) group. The levels of uric acid in urine were similar in all groups (Figures 3A and 3B). No differences were seen in serum and urine sodium and potassium levels (Figures 4 A-D).

Finally, diuresis, body weight, food intake and water consumption of the animals were evaluated. A significant difference was observed between the diuresis of the pathological group (Gent) compared to the control group (Veh), as the urine volume in the Gent group was higher. The animals with kidney damage suffered a significant weight loss compared to the control group, while the animals treated with the extract (50, 100, 200, and 400 mg/kg) maintained the body weight closely related to the control group. There was no variation in terms of food or water intake by the animals (Figures 5A and 5B).

A concentração sérica de ácido úrico do grupo patológico (Gent) foi significativamente mais elevada em comparação com o controlo (86%,  $p < 0,05$ ) e com a silimarina (64%,  $p < 0,05$ ). Os animais tratados com o extrato (50, 100, 200 e 400 mg/kg), exibiram concentrações mais baixas do que o grupo Gent e estavam mais próximos do grupo da silimarina (Sil). Os níveis de ácido úrico na urina foram semelhantes em todos os grupos (Figuras 3A e 3B). Não foram observadas diferenças nos níveis de sódio e potássio no soro e na urina (Figuras 4 A-D).

Por fim, foram avaliados a diurese, o peso corporal, a ingestão de alimentos e o consumo de água dos animais. Foi observada uma diferença significativa entre a diurese do grupo patológico (Gent) e a do grupo de controlo (Veh), uma vez que o volume de urina no grupo Gent era mais elevado. Os animais com lesões renais sofreram uma perda de peso significativa em comparação com o grupo de controlo, enquanto os animais tratados com o extrato (50, 100, 200 e 400 mg/kg) mantiveram o peso corporal muito próximo do grupo de controlo. Não se registou qualquer variação em termos de ingestão de alimentos ou de água pelos animais (Figuras 5A e 5B).



**Figure 5 - Effect of *Bauhinia forficata* na diurese (A) e na diferença de peso corporal (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett.**

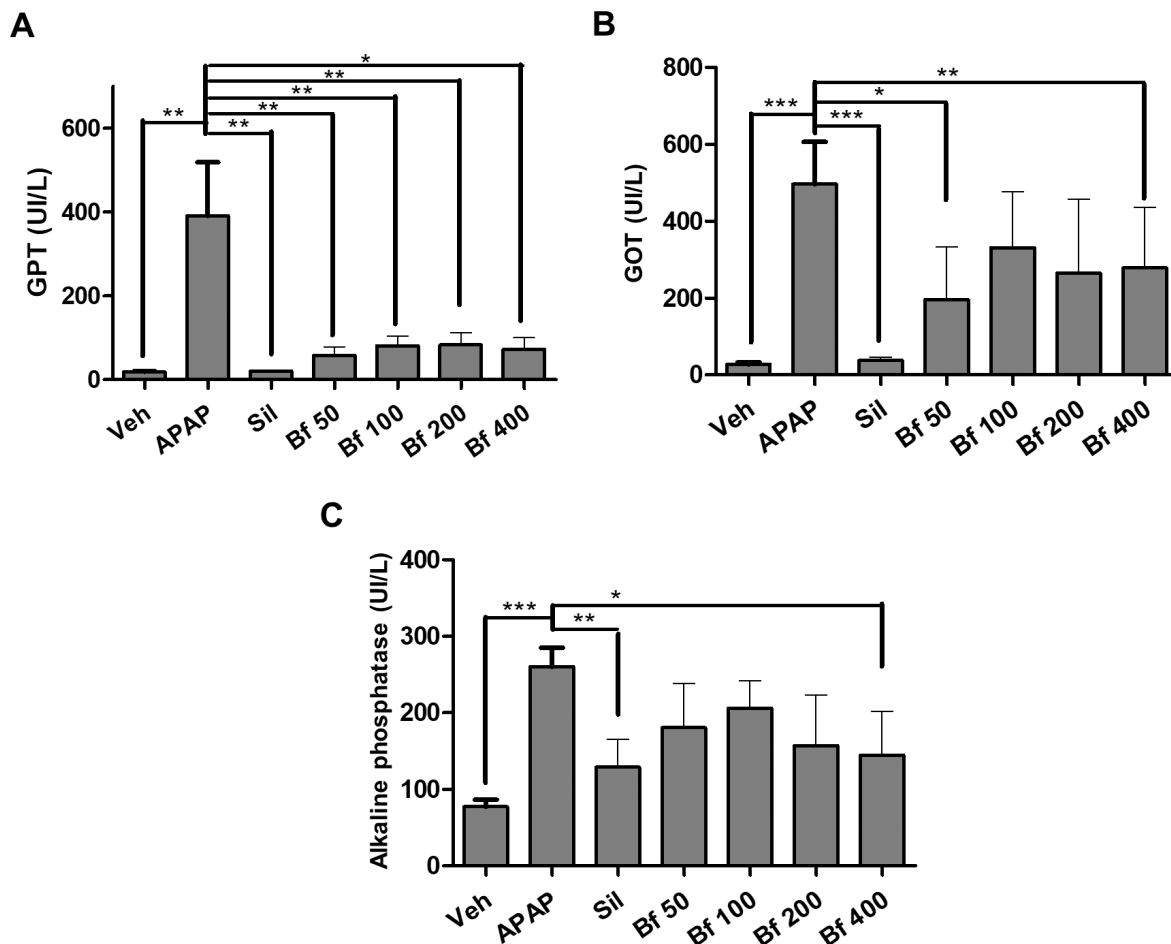
**Figura 5 - Efeito da *Bauhinia forficata* na diurese (A) e na diferença de peso corporal (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett.**

### Determination of hepatoprotective effect

The main marker of liver damage is the activity of the enzyme GPT. A significant difference ( $p < 0.01$ ) was found between the control group (Veh) and the pathological group (APAP), and between the APAP group and silymarin (Sil,  $p < 0.01$ ). With these results, the validity of the method for this type of study was verified. *B. forficata* extract prevented the elevation of GPT enzyme activity, evidenced by a significant difference between GPT levels when compared to the APAP group (50,  $p < 0.01$ ; 100,  $p < 0.01$ ; 200,  $p < 0.01$ ; 400  $p < 0.05$  mg/kg).

### Determinação do efeito hepatoprotector

O principal marcador de danos no fígado foi a atividade da enzima GPT. Encontrámos uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo de controlo (Veh) e o grupo patológico (APAP), e entre o grupo APAP e a silimarina (Sil,  $p < 0,01$ ). Com estes resultados, verificou-se a validade do método para este tipo de estudo. O extrato de *B. forficata* preveniu a elevação da atividade da enzima GPT, evidenciada por uma diferença significativa entre os níveis de GPT quando comparados com o grupo APAP (50,  $p < 0,01$ ; 100,  $p < 0,01$ ; 200,  $p < 0,01$ ; 400  $p < 0,05$  mg/kg).



**Figure 6** - Serum levels (U/l) of GOT (A), GPT (B), and Alkaline phosphatase (C) of mice ( $n = 6$ ) treated with *Bauhinia forficata* leaves extract. Veh: water, APAP: acetaminophen, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). The data are plotted as average  $\pm$  SD. ANOVA of one factor, followed by the Dunnett's test was used,  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from APAP).

**Figura 6** - Níveis séricos (U/l) de GOT (A), GPT (B) e fosfatase alcalina (C) de ratinhos ( $n = 6$ ) tratados com extrato de folhas de *Bauhinia forficata*. Veh: água, APAP: acetaminofeno, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Dunnett foi usado,  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , significativamente diferente do APAP).

Regarding the activity of the GOT enzyme, the pathological group (APAP) showed a significant difference ( $p < 0.001$ ) compared to the animals in control group (Veh) and the animals treated with silymarin (Sil). *B. forficata* extract prevented the increase in enzyme activity produced by paracetamol, moreover, 50 ( $p < 0.05$ ) and 400 ( $p < 0.01$ ) mg/kg showed significant differences when compared to the APAP group.

Finally, the activity of the enzyme alkaline phosphatase was determined. The pathological group (APAP) ALP activity was statistically different ( $p < 0.001$ ) from control (Veh) and silymarin (Sil,  $p < 0.01$ ) groups. In the groups that received the extract, the activity decreased, the difference with the APAP group was significant ( $p < 0.05$ ) in the group of animals treated with 400 mg/kg of *B. forficata* (Figures 6A-C).

## Discussion

Medicinal plants as potential therapeutic agents are of vital importance throughout the world's healthcare system. Several plants demonstrated their efficacy and could be used as a therapeutic alternative to prevent and treat various liver and kidney conditions. The methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves tested in this study proved to be safe at least up to 2000 mg/kg based on acute toxicity tests performed on mice, and results described previously. It has previously been reported that this plant is safe to use and does not present drug interactions (19). The nephroprotective and hepatoprotective effects were evaluated in our study using models of chemically induced kidney and liver injury in Swiss albino mice.

Aminoglycosides have nephrotoxic effects due to the induction of Reactive oxygen species (ROS) and depletion of antioxidant enzyme activities in the kidney. Gentamicin administration caused marked changes in kidney tubules due to gentamicin reabsorption in proximal convoluted tubules, causing degeneration and necrosis of the epithelial cells of the tubules. These changes were manifested by dilated tubules, loss of brush border, severe leucocyte infiltrations, tubular degeneration, and presence of tubular casts (27).

Gentamicin-induced kidney damage is mainly characterized by an increase in serum creatinine concentration, which indicates a reduction in

Em relação à atividade da enzima GOT, o grupo patológico (APAP) apresentou uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em comparação com os animais do grupo de controlo (Veh) e os animais tratados com silimarina (Sil). O extrato de *B. forficata* impediu o aumento da atividade enzimática produzido pelo paracetamol, além disso, 50 ( $p < 0,05$ ) e 400 ( $p < 0,01$ ) mg/kg mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo APAP.

Finalmente, foi determinada a atividade da enzima fosfatase alcalina. A atividade da ALP do grupo patológico (APAP) foi estatisticamente diferente ( $p < 0,001$ ) dos grupos de controlo (Veh) e silimarina (Sil, ( $p < 0,01$ )). Nos grupos que receberam o extrato, a atividade diminuiu, mas a diferença com o grupo APAP foi significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo de animais que foi tratado com 400 mg/kg de *B. forficata* (Figuras 6A-C).

## Discussão

As plantas medicinais como potenciais agentes terapêuticos são de importância vital em todos os sistemas de saúde. Várias plantas provaram ser alternativas terapêuticas eficazes na prevenção e tratamento de diversas doenças do fígado e dos rins. O extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* testado neste estudo provou ser seguro, pelo menos até 2000 mg/kg, com base em testes de toxicidade aguda realizados em ratos e nos resultados descritos anteriormente. Foi anteriormente referido que esta planta é segura para utilização e não apresenta interações medicamentosas (19). Os efeitos nefroprotectores e hepatoprotectores foram avaliados em ratinhos albinos suíços utilizando modelos de lesão renal e hepática quimicamente induzidas.

Os aminoglicosídeos têm efeitos nefrotóxicos devido à indução de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e à depleção das actividades das enzimas antioxidantes no rim. A administração de gentamicina provocou alterações acentuadas nos túbulos renais devido à reabsorção de gentamicina nos túbulos contorcidos proximais, causando degeneração e necrose das células epiteliais dos túbulos. Estas alterações manifestaram-se através de túbulos dilatados, perda do bordo em escova, infiltrações leucocitárias graves, degeneração tubular e presença de cilindros tubulares (27).

A lesão renal induzida pela gentamicina caracteriza-se principalmente por um aumento da concentração de creatinina sérica, o que indica uma redução da

glomerular filtration rate, and is also frequently associated with an increase in serum urea and uric acid concentration (28). Our results showed that daily administration for nine days (Gent group) increased creatinine, urea, and uric acid in serum in agreement with other results reported (28, 29). The concentration of creatinine in urine was also slightly increased, as expected (29, 30).

APAP is the most used model of intrinsic drug-induced liver injury. APAP is converted to an electrophile thought to be N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), catalyzed by cytochrome P450 enzymes. NAPQI then binds to sulfhydryl groups on glutathione and proteins. Depletion of GSH makes the cells more susceptible to oxidative stress (31). Hepatotoxicity was achieved by intraperitoneal administration of paracetamol, 300 mg/kg body weight, used as a single administration on the last day of treatment. Liver damage was evidenced by elevated activity of liver enzymes GPT, GOT, and ALP (15-17).

Silymarin (150 mg/kg) was used in both nephroprotection and hepatoprotection assays, as previously described. The use of silymarin as a positive control in hepatoprotection models has been widely documented and validated in this type of study (15, 16, 17, 30, 32). In addition, the mechanism of the hepatoprotective effect of silymarin has been previously detailed (8). In contrast, in nephroprotection assay models, the use of silymarin to prevent kidney damage is more limited; despite this, it is still the most used option in this type of research (15, 32).

Silymarin attenuated the toxic effect of gentamicin in mice (Sil group). Some reports have indicated that silymarin has a modest nephroprotection effect against damage from nephrotoxic agents such as gentamicin (8), and its nephroprotective effect was demonstrated in previous research in our laboratory (16).

All animals treated with the doses tested of the methanolic extract of *B. forficata* leaves (50, 100, 200 and 400 mg/kg) prevented kidney damage caused by gentamicin, evidenced mainly by reduced creatinine levels in serum (33, 34), compared to the pathological group (Gent). Serum urea and uric acid in the groups treated with the extract was closer to the value measured in control group (Veh), as reported in the literature when nephroprotective potential of *Carica papaya* seeds (35) and *Croton zambesicus* root (36) extracts were evaluated.

taxa de filtração glomerular, estando frequentemente associada a um aumento da concentração sérica de ureia e de ácido úrico (28). Os nossos resultados mostraram que a administração diária de gentamicina durante nove dias (grupo Gent) aumentou a creatinina, a ureia e o ácido úrico no soro, em concordância com outros resultados relatados (28, 29). A concentração de creatinina na urina também aumentou ligeiramente, como esperado (29, 30).

O APAP é o modelo mais utilizado de lesão hepática intrínseca induzida por fármacos. O APAP é convertido num eletrófilo que se pensa ser a N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), catalisado pelas enzimas do citocromo P450. A NAPQI liga-se então a grupos sulfidrilo no glutatião e nas proteínas. A depleção de GSH torna as células mais susceptíveis ao stress oxidativo (31). A hepatotoxicidade foi conseguida através da administração intraperitoneal de paracetamol, 300 mg/kg de peso corporal, utilizada como administração única no último dia de tratamento. A lesão hepática foi evidenciada pela atividade elevada das enzimas hepáticas GPT, GOT e ALP (15-17).

A silimarina (150 mg/kg) foi utilizada nos ensaios de nefroprotecção e hepatoprotecção, como previamente descrito. A utilização da silimarina como controlo positivo em modelos de hepatoprotecção foi amplamente documentada e validada neste tipo de estudo (15, 16, 17, 30, 32). Além disso, o mecanismo do efeito hepatoprotector da silimarina foi previamente detalhado (8). Em contrapartida, nos modelos de ensaio de nefroprotecção, a utilização da silimarina para prevenir lesões renais é mais limitada; apesar disso, continua a ser a opção mais utilizada neste tipo de investigação (15, 32).

A silimarina atenuou o efeito tóxico da gentamicina em ratinhos (grupo Sil). Alguns relatórios indicaram que a silimarina tem um efeito modesto de nefroprotecção contra danos causados por agentes nefrotóxicos como a gentamicina (8), e o seu efeito nefroprotector foi demonstrado em investigações anteriores no nosso laboratório (16).

Todos os animais tratados com as doses testadas do extrato metanólico das folhas de *B. forficata* (50, 100, 200 e 400 mg/kg) preveniram a lesão renal causada pela gentamicina, evidenciada principalmente pela redução dos níveis de creatinina no soro (33, 34), em comparação com o grupo patológico (Gent). A ureia e o ácido úrico séricos nos grupos tratados com o extrato estavam mais próximos do valor medido no grupo de controlo (Veh), tal como referido na literatura quando foi avaliado o potencial nefroprotector dos extractos das sementes de *Carica papaya* (35) e da raiz de *Croton zambesicus* (36).



Considering that the plant is popularly used for the treatment of kidney disorders, the concentrations of creatinine, urea, and uric acid in urine, together with serum and urinary sodium and potassium were also measured. It was determined that the *B. forficata* extract had no significant effects on these parameters (urinary creatinine, urea, and uric acid), in agreement with previous works reported on *Butea monosperma* and *Piper cubeba* (33, 34). Likewise, no difference was found between electrolyte levels, neither in serum nor in urine, as reported for *Carica papaya* (35) and *Croton zambesicus* (36). This is likely because these electrolytes are subject to complex physiological, metabolic, and hormonal regulations (35), so no significant changes have been seen in the levels of these components in the established experimental conditions. The complex regulation includes renal excretion, water intake, electrolytes balance, osmolarity, and volume of body fluids, regulated by vasopressin, aldosterone, and the effect of osmoreceptors, among others (37).

Finally, diuresis, body weight variation, food consumption, and water intake of the different test groups were also evaluated after 24 hours in metabolic cages. Diuresis augmented in Gent group, due to decreased number of functioning nephrons and increased filtration rate. Some evidence indicates that aminoglycosides interfere with the action of vasopressin on the distal nephron (38). The increased diuresis in all groups treated with the extract, compared to the control group is due to the flavonoids content, previously reported as being responsible for diuresis (19). The analysis of body weight, food, and drink has not been reported previously, it was considered that they could contribute to the enrichment of the experimental model used, providing new evidence in the pathological models used. The pathological group had lower body weight ( $p < 0.05$ ), and lower food and water intake (although not significant differences). Significant reduction in body weight in rats with kidney damage induced by gentamicin in a 22 day experiment were reported previously (39). In this study, differences reported correspond to the animals' weight after 24 hours in metabolic cages.

Regarding the hepatoprotection test of the *B. forficata* extract, it was shown that all the doses tested (50, 100, 200 and 400 mg/kg) proved to be effective in protecting mice from liver damage caused

Tendo em conta que a planta é utilizada popularmente para o tratamento de distúrbios renais, foram também medidas as concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico na urina, juntamente com o sódio e o potássio séricos e urinários. Concluímos que o extrato de *B. forficata* não tinha efeitos significativos nestes parâmetros (creatinina urinária, ureia e ácido úrico), em concordância com trabalhos anteriores relatados em *Butea monosperma* e *Piper cubeba* (33, 34). Da mesma forma, não se verificou qualquer diferença entre os níveis de electrólitos, nem no soro nem na urina, tal como referido para *Carica papaya* (35) e *Croton zambesicus* (36). Isto deve-se provavelmente ao facto de estes electrólitos estarem sujeitos a uma regulação fisiológica, metabólica e hormonal complexa (35), pelo que não foram observadas alterações significativas nos níveis destes componentes nas condições experimentais estabelecidas. A complexa regulação inclui a excreção renal, a ingestão de água, o equilíbrio dos electrólitos, a osmolaridade e o volume dos fluidos corporais, regulados pela vasopressina, aldosterona e o efeito dos osmorreceptores, entre outros (37).

Finalmente, a diurese, a variação do peso corporal, o consumo de alimentos e a ingestão de água dos diferentes grupos de teste foram também avaliados após 24 horas em gaiolas metabólicas. A diurese aumentou no grupo Gent, devido à diminuição do número de nefrónios funcionais e ao aumento da taxa de filtração. Algumas evidências indicam que os aminoglicosídeos interferem com a ação da vasopressina no néfron distal (38). O aumento da diurese em todos os grupos tratados com o extrato, em comparação com o grupo de controlo, deve-se ao conteúdo de flavonóides, previamente relatado como sendo responsável pela diurese (19). A análise do peso corporal, da alimentação e da bebida não foi relatada anteriormente, considerou-se que poderiam contribuir para o enriquecimento do modelo experimental utilizado, fornecendo novas evidências nos modelos patológicos utilizados. O grupo patológico apresentou menor peso corporal ( $p < 0,05$ ), e menor ingestão de alimentos e água (embora sem diferenças significativas). Uma redução significativa do peso corporal em ratinhos com lesão renal induzida por gentamicina numa experiência de 22 dias foi relatada anteriormente (39). Neste estudo, as diferenças relatadas correspondem ao peso dos animais após 24 horas em gaiolas metabólicas.

No que diz respeito ao teste de hepatoprotecção do extrato de *B. forficata*, verificou-se que todas as doses testadas (50, 100, 200 e 400 mg/kg) se revelaram eficazes na protecção dos ratinhos contra as lesões hepáticas causadas pelo paracetamol. Estes resultados

by paracetamol. These results agree with those obtained with another species of the same genus, *Bauhinia variegata* (40). The presence of gallic acid and at least 39 flavonoids, such as rutin, quercetin and kaempferol has been reported in *Bauhinia forficata* (22, 41, 42). These compounds have antioxidant properties due to the ability to neutralize oxidizing species such as superoxide radicals. The antioxidant activity of *B. forficata* has been widely demonstrated and associated with flavonoid composition (19), as the activity reported in studies of an extract of *Bauhinia variegata* leaves (12). Hepatoprotective effect in diabetic mice was previously reported, and the effect attributed to the phenolic content (43). Moreover, the presence of trigonelline, an antioxidant alkaloid, has also been reported (44). Other species, with components in common such as *Opuntia ficus indica* and *Zea mais*, demonstrated a similar hepatoprotective effect, so it could be that the intrinsic mechanism by which these plants exert their effect is associated with the antioxidant capacity (15).

Different pharmacological activities have been reported for many *Bauhinia* species, including hepatoprotective and antioxidant. The leaves of *Bauhinia forficata* are reported to have antidiabetic, antioxidant, antibacterial, antiproliferative, antiulcerogenic, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects in diabetic mice, among others (19). The present study was carried out to evaluate the protective activities of the methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves in mice induced to acute hepatotoxicity and nephrotoxicity. These preliminary results indicate that it will be important to continue with the evaluation of the effect of this extract on other parameters that allow us to determine the antioxidant capacity, and the anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. More studies are required to understand mechanistic pathways of protection observed.

## Conclusion

The preliminary evaluation of the methanolic extract of *Bauhinia forficata* leaves demonstrated moderate nephroprotective activity in mice with kidney damage induced by gentamicin, achieving significant control over the alteration of serum creatinine concentration. The extract slightly affected the serum urea and uric acid values and had very little effect on the urine parameters measured. In addition, it was shown that the extract has a marked hepatoprotective activity. Our in vivo results partially validate the popular use

estão de acordo com os obtidos com outra espécie do mesmo género, *Bauhinia variegata* (40). A presença de ácido gálico e de pelo menos 39 flavonóides, como a rutina, a quercetina e o kaempferol, foi registada na *Bauhinia forficata* (22, 41, 42). Estes compostos têm propriedades antioxidantes devido à capacidade de neutralizar espécies oxidantes, como os radicais superóxido. A atividade antioxidante da *B. forficata* tem sido amplamente demonstrada e associada à composição de flavonóides (19), tal como a atividade relatada em estudos de um extrato de folhas de *Bauhinia variegata* (12). O efeito hepatoprotector em ratinhos diabéticos foi previamente relatado, e o efeito atribuído ao conteúdo fenólico (43). Além disso, foi também registada a presença de trigonelina, um alcaloide antioxidante (44). Outras espécies, com componentes em comum, como *Opuntia ficus indica* e *Zea mais*, demonstraram um efeito hepatoprotector semelhante, pelo que pode ser que o mecanismo intrínseco pelo qual estas plantas exercem o seu efeito esteja associado à sua capacidade antioxidante (15).

Foram relatadas diferentes actividades farmacológicas para muitas espécies de *Bauhinia*, incluindo as hepatoprotectora e antioxidante. As folhas de *Bauhinia forficata* têm efeitos antidiabéticos, antioxidantes, antibacterianos, antiproliferativos, antiulcerogénicos, anti-inflamatórios e hepatoprotectores em ratinhos diabéticos, entre outros (19). O presente estudo foi realizado para avaliar as actividades protectoras do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* em ratinhos induzidos a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade agudas. Estes resultados preliminares indicam que será importante continuar com a avaliação do efeito deste extrato noutros parâmetros que nos permitam determinar a capacidade antioxidante e as acções anti-inflamatórias e anti-stress oxidativo. São necessários mais estudos para compreender as vias mecanicistas da protecção observada.

## Conclusão

A avaliação preliminar do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* demonstrou uma atividade nefroprotectora moderada em ratinhos com lesões renais induzidas pela gentamicina, conseguindo um controlo significativo da alteração da concentração de creatinina sérica. O extrato afectou ligeiramente os valores séricos de ureia e ácido úrico e teve um efeito muito reduzido nos parâmetros de urina medidos. Além disso, foi demonstrado que o extrato tem uma atividade

of *B. forficata*. More experiments will be required to evaluate its effects on tissues, elucidate the mechanism and identify the compounds responsible for the effect observed.

### **Funding sources**

This research was supported by Facultad de Ciencias Químicas, and Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, from Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. SFR conducted the work during her master's program (MCB) supported by CONACYT, PROCIENCIA Program, resources from FEEL of FONACIDE, Paraguay (PROCIENCIA POSG17-59).

### **Author contributions**

SFR and AKG performed assays and collected data. SFR, MLK and MACB analyzed the data. PMFT, MAC-B, and MLK conceived and designed the experiments. MAC-B and MLK wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the team of Professor R. Degen, who collected and identified the plant material, Dr. N. Alvarenga, who provided the extract, and Mr. N. Kennedy for the English language revision.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

hepatoprotectora marcada. Os nossos resultados in vivo validam parcialmente a utilização popular da *B. forficata*. Serão necessárias mais experiências para avaliar os seus efeitos nos tecidos, elucidar o mecanismo e identificar os compostos responsáveis pelo efeito observado.

### **Fontes de financiamento**

Esta pesquisa foi apoiada pela Facultad de Ciencias Químicas e pelo Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, da Universidad Nacional de Asunción, Paraguai. SFR realizou o trabalho durante seu programa de mestrado (MCB) apoiado pelo CONACYT, Programa PROCIENCIA, recursos do FEEL do FONACIDE, Paraguai (PROCIENCIA POSG17-59).

### **Contribuição dos autores**

SFR e AKG efectuaram ensaios e recolheram dados. SFR, MLK e MACB analisaram os dados. PMFT, MAC-B e MLK conceberam e projectaram as experiências. MAC-B e MLK redigiram o artigo. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à equipa do Professor R. Degen, que recolheu e identificou o material vegetal, ao Dr. N. Alvarenga, que forneceu o extrato, e ao Sr. N. Kennedy pela revisão da língua inglesa.

### **Conflitos de interesses**

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

## References / Referências

1. Cosola, C., Sabatino, A, Di Bari, I., Fiaccadori, E., & Gesualdo, L. (2018). Nutrients, Nutraceuticals, and Xenobiotics Affecting Renal Health. *Nutrients*, 10(7), 808. <https://doi.org/10.3390/nu10070808>
2. Gu, X., & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert reviews in molecular medicine*, 14, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
3. Prikhodko, V., Bezborodkina, N. & Okovityi, S. (2022). Pharmacotherapy for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Emerging Targets and Drug Candidates. *Biomedicines*, 10(2), 274. doi: 10.3390/biomedicines10020274
4. Instituto Nacional de Nefrología. (2019). Informe INN, Hemodiálisis Crónica. Available at: [6b307e-Informe2019INN.pdf](https://6b307e-Informe2019INN.pdf) (mspbs.gov.py)
5. Luyckx, V. A., Al-Aly, Z., Bello, A. K., Bellorin-Font, E., Carlini, R. G., Fabian, J., Garcia-Garcia, G., Iyengar, A., Sekkarie, M., van Biesen, W., Ulasi, I., Yeates, K., & Stanifer, J. (2021). Sustainable Development Goals relevant to kidney health: an update on progress. *Nature reviews. Nephrology*, 17(1), 15–32. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00363-6>
6. Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2023). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
7. Ye, F., Zhai, M., Long, J., Gong, Y., Ren, C., Zhang, D., Lin, X., & Liu, S. (2022). The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study. *Frontiers in public health*, 10, 909455. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.909455>
8. Kim, Y., Na, J., Kwon, D. & Park, J. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity via up-regulation of the glutathione conjugation capacity in mice. *Journal of functional food*, 49, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.025>
9. Adeneye, A. & Benebo, A. (2008). Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.025>
10. Khan, S. A., Priyamvada, S., Farooq, N., Khan, S., Khan, M. W., & Yusufi, A. N. (2009). Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacological research*, 59(4), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.12.009>
11. Dungca, N. (2016). Protective effect of the methanolic leaf extract of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae) against gentamicin-induced nephrotoxicity in Sprague Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 18–21. doi:10.1016/j.jep.2016.03.002
12. Bashandy, S. A. E., El Awdan, S. A., Mohamed, S. M., & Omara, E. A. A. (2020). *Allium porrum* and *Bauhinia Variegata* mitigate acute liver failure and nephrotoxicity induced by thioacetamide in male rats. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 35(2), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0803-5>
13. Hina, G., Muhammad, A., Salina, S., Yazeed, A., Falak, S., Eilaf, A., Umara, A., Syed, M., Asghar, K., Muhammad, G. & Ghazala, K. (2021). Quantification of biochemical compounds in *Bauhinia Variegata* Linn flower extract and its hepatoprotective effect. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.056>
14. Oliveira, G. O., Braga, C. P., & Fernandes, A. A. (2013). Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.&Endl.) treatment. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
15. Ben Saad, A., Dalel, B., Rjeibi, I., Smida, A., Ncib, S., Zouari, N., & Zourgui, L. (2017). Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 516–525. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1255976>
16. Soverina, M., Campuzano-Bublitz, M., Centurión, J., Galeano, A. & Kennedy, M. (2019). Preliminary evaluation of hepatoprotective and nephroprotective effects of *Prosopis ruscifolia* Griseb. leaves extract in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences* 9(12), 37–41. doi: 10.7324/JAPS.2019.91206
17. Velázquez, A., Diarte, E., Henichen, O., Montalbetti, Y., Campuzano-Bublitz, M., Kennedy, M., Hellión-Ibarrola, M. & Ibarrola, D. (2020). *Baccharis crispa* attenuates toxic hepatitis induced by acetaminophen and carbon tetrachloride in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10(11), 110–116. doi: 10.7324/JAPS.2020.101115
18. Velázquez, A., Diarte, E., Galeano, A., Burgos-Edwards, A., Alvarenga, N., Heinichen, O., Montalbetti, Y., Campuzano-Bublitz, M., Kennedy, M., Hellión-Ibarrola, M. & Ibarrola, D. (2021). Hepatoprotective activity of *Dorstenia brasiliensis* against acute hepatitis induced by acetaminophen and carbon tetrachloride in mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 12, 6384–6392. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(12).6384-92
19. Cechinel-Zanchett, C., de Andrade, S. & Cechinel-Filho, V. (2018). Ethnopharmacological, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Bauhinia forficata*: A Mini-Review Covering the Last Five Years. *Natural Product Communications* 13(7), 911–916. doi:10.1177/1934578X1801300732
20. Cechinel-Zanchett, C., Melo, R., Tenfen, A., Siebert, D., Micke, G., Vitali, G., Cechinel-Filho, V., Faloni, S. & de Souza, P. (2019). *Bauhinia forficata* link, a Brazilian medicinal plant traditionally used to treat cardiovascular disorders, exerts endothelium-dependent and independent vasorelaxation in thoracic aorta of normotensive and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 243, 112118. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112118>
21. Miceli, N., Buongiorno, L., Celi, M., Cacciola, F., Dugo, P., Donato, P., Mondello, L., Bonaccorsi, I. & Taviano, M. (2016). Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Natural product research*, 11, 1229–1239. doi: 10.1080/14786419.2015.1050671
22. Cechinel-Filho, V. (2009). Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research* 23(10), 1347–1354. <https://doi.org/10.1002/ptr.2756>
23. National Research Council (US). (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. 8<sup>th</sup> ed. Washington, United States. National Academies Press (US). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910
24. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, (2022). <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/15487898>
25. Dufour, D., Lott, J., Nolte, F., Gretch, D., Koff, R. & Seeff, L. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* 46(12), 2027–2049. doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2027.
26. Strömme, J. & Eldjam, L. (1974). Scandinavian Standardizations of Enzyme Determination. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 33(4), 287–289. doi: 10.1080/00365517409082498
27. Randjelovic, P., Veljkovic, S., Stojiljkovic, N., Sokolovic, D., & Ilic, I. (2017). Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI journal*, 16, 388–399. <https://doi.org/10.17179/excli2017-165>.
28. Raju, S., Kavimani, S., Maheshwara Rao, V. U., Reddy, K. S., & Kumar, G. V. (2011). Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity *in vivo*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(9), 680–685. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60173-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60173-9)
29. Rajamurugan, R., Suyavaran, A., Selvaganabathy, N., Ramamurthy, C., Reddy, G., Sujatha, V. & Thirunavukkarasu, C. (2012). *Brassica nigra* plays a remedy role in hepatic and renal damage. *Pharmaceutical Biology* 50(12), 1488–1497. doi: 10.3109/13880209.2012.685129
30. Abdel-Kader, M., Alanazi, M., Bin, A., Al-Saikhan, F. & Hamad, A. (2017). Hepatoprotective and nephroprotective activities of *Juniperus sabina* L aerial parts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 5(1), 29–39.
31. McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2019). Animal models of drug-induced liver injury. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>
32. Ezejiofor, A., Orish, C. & Orisakwe, O. (2014). *Costus afer* ker gawl leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 8(4), 310–313. PMID: 25001137
33. Sonkar, N., Ganeshpurkar, A., Yadav, P., Dubey, S., Bansal, D., & Dubey, N. (2014). An experimental evaluation of nephroprotective potential of *Butea monosperma* extract in albino rats. *Indian journal of pharmacology*, 46(1), 109–112. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.125190>

34. Ahmad, Q. Z., Jahan, N., Ahmad, G., & Tajuddin (2012). Nephroprotective effect of Kabab chini (Piper cubeba) in gentamycin-induced nephrotoxicity. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 23(4), 773–781. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.98159>
35. Olagunju, J., Adeneye, A., Fagbohunka, B., Bisuga, N., Ketiku, A., Benebo, A., Olufowobi, O., Adeoye, A., Alimi, M. & Adeleke, A. (2009). Nephroprotective activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn. in carbon tetrachloride induced renal injured Wistar rats: a dose- and time-dependent study. *Biology and Medicine* 1(1), 11-19.
36. Okokon, J. E., Nwafor, P. A., & Noah, K. (2011). Nephroprotective effect of Croton zambesicus root extract against gentimicin-induced kidney injury. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(12), 969–972. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60228-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60228-9)
37. Atherton, J. (2006). Regulation of fluid and electrolyte balance by the kidney. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 7(7), 227–233. <https://doi.org/10.1053/j.mpaic.2006.04.002>
38. Kaloyanides, G. J., & Pastoriza-Munoz, E. (1980). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney international*, 18(5), 571–582. <https://doi.org/10.1038/ki.1980.175>
39. Govindappa, P.K., Gautam, V., Tripathi, S.M., Sahni, Y.P., Raghavendra, H.L. (2019). Effect of *Withania somnifera* on gentamicin induced renal lesions in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.005>
40. Bodakhe, S. & Ram, A. (2007). Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127(9), 1503–1507. doi: 10.1248/yakushi.127.1503
41. Silva, K. & Cechinel-Filho, V. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, 3, 449-454. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300018>
42. Franco, R. R., Mota Alves, V. H., Ribeiro Zabisky, L. F., Justino, A. B., Martins, M. M., Saraiva, A. L., Goulart, L. R., & Espindola, F. S. (2020). Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 123, 109798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>
43. Salgueiro, A. C., Folmer, V., da Silva, M. P., Mendez, A. S., Zemolin, A. P., Posser, T., Franco, J. L., Puntel, R. L., & Puntel, G. O. (2016). Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 8902954. <https://doi.org/10.1155/2016/8902954>
44. Toloza-Zambrano, P., Avello, M. & Fernandez, P. (2015). Determination of rutin and trigonelline in extracts of *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and hypoglycemic effect on diabetic and prediabetic patients humans. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe De Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14 (1), 21–32.

## Food and Nutrition Knowledge of Elementary School Teachers in a Region of Lisbon, Portugal

### Conhecimento em Alimentação e Nutrição de Professores do Ensino Básico numa uma Região de Lisboa, Portugal

Andreia Pedro <sup>1</sup>, Cíntia Ferreira-Pêgo <sup>2</sup> , Carina Rossoni <sup>2</sup> , Emília Alves <sup>2</sup>  

**Keywords:** Food, nutrition, knowledge, elementary school teachers

**Palavras-chave:** Alimentos, nutrição, conhecimento, professores ensino básicos

#### To Cite:

Pedro, A., Ferreira-Pêgo, C., Rossoni, C., Alves, E. (2023) Food and Nutritional Knowledge of Elementary School Teachers. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 83-92.

 [10.19277/bbr.20.1.313](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.313)

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

2 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[emilia.alves@ulusofona.pt](mailto:emilia.alves@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 17/04/2023  
Accepted / Aceite: 23/06/2023

#### Abstract

Children's eating habits are formed during childhood and are significantly influenced by the school environment, which is why teachers are seen as an example of behavior to imitate. For children to receive accurate information, teachers must have a solid understanding of food and nutrition. This study aimed to assess the level of food and nutrition understanding in elementary school teachers. Eighty-one teachers participated in a cross-sectional observational study. A 9-question survey was built to gauge their level of understanding about food and nutrition, with three levels established: high ( $\geq 7$  points), moderate (4-6 points), and low ( $\leq 3$  points). In this research, whereas 79% of instructors taught nutritional principles and 44% had a moderate degree of understanding on food and nutrition, 63% of teachers had poor levels of training in nutrition. The teachers' greatest difficulties were related to the nutritional value of foods, regardless of their years of experience. Teachers who have been teaching for less than five years have a better degree of knowledge in food and nutrition, compared to those who have been teaching longer ( $p < 0.001$ ). This study supports the idea that elementary school instructors need more dietary education, especially those who have been teaching for more years.

#### Resumo

Os hábitos alimentares das crianças formam-se durante a infância e são significativamente influenciados pelo ambiente escolar, razão pela qual os professores são vistos como um exemplo de conduta a imitar. Para que as crianças recebam informações precisas, os professores devem ter uma compreensão sólida de alimentação e nutrição. Este estudo pretendeu avaliar o nível de compreensão alimentar e nutricional de professores do 1º ciclo do ensino básico. Oitenta e um professores participaram de um estudo observacional transversal. Foi construído um questionário com 9 perguntas para avaliar o seu nível de conhecimento sobre alimentação e nutrição, com três níveis estabelecidos: elevado ( $\geq 7$  pontos), moderado (4-6 pontos) e baixo ( $\leq 3$  pontos). Neste estudo, enquanto 79% dos instrutores ensinavam princípios nutricionais e 44% tinham um nível moderado de conhecimentos em alimentação e nutrição, 63% dos professores tinham maus níveis de formação em nutrição. As maiores dificuldades dos professores diziam respeito ao valor nutricional dos alimentos, independentemente dos seus anos de experiência. Professores que lecionam há menos de cinco anos apresentam melhor grau de conhecimento em alimentação e nutrição, em comparação com os que lecionam há mais tempo ( $p < 0,001$ ). Este estudo corrobora a ideia de que os instrutores do primeiro ciclo do ensino básico precisam de mais educação alimentar, principalmente aqueles que lecionam há mais anos.

## Introduction

Food-related disorders, such as obesity, have been extensively linked to bad eating practices, which may be a consequence of an inadequate level of nutritional awareness in both adults and children (1-4). Long-lasting dietary habits are developed during childhood and the dietary preferences of children are generally defined by personal experiences, observation, and education rather than the nutritional value of the meal (5-7). Children's food education is significantly influenced by the school community, both by the time the child stays and because this is a privileged place of learning, which reinforces the idea that the child's social environment can profoundly affect their eating patterns (8). As role models, elementary school teachers have the potential to influence the development of healthy eating habits that children can carry over into adulthood (5,6,9). Thus, it is crucial for educators to be knowledgeable about nutrition and food to ensure that their students are receiving accurate information (10), making it clear that educators need to increase their level of nutrition awareness (11). The literature on teachers' nutritional knowledge is scarce, so this study aimed to assess the level of food and nutritional knowledge of elementary school teachers.

## Materials and methods

This research comprises of an observational, quantitative cross-sectional study of elementary school teachers to assess their degree of knowledge on food and nutrition. The participants were recruited by convenience in the school group *Amadora-Oeste* located in the Lisbon (Portugal) region. Recruitment was conducted between April and May 2022, using a digital survey made available via email for data collection to all teachers belonging to the school group. Eighty-one elementary school teachers answered the questionnaire and were included in the study. All participants submitted their informed consent after receiving information that all data would be kept anonymous and utilized purely and exclusively for this inquiry. The Helsinki Declaration's guiding principles and any applicable revisions were followed while conducting the study (12).

## Introdução

Distúrbios relacionados com a alimentação, como a obesidade, têm sido cada vez mais associados a más práticas alimentares, o que pode ser consequência de níveis inadequados de consciência nutricional em adultos e crianças (1-4). Hábitos alimentares duradouros são desenvolvidos durante a infância e as preferências alimentares das crianças são geralmente definidas por experiências pessoais, observação e educação, e não pelo valor nutricional da refeição (5-7). A educação alimentar infantil é significativamente influenciada pela comunidade escolar, quer pelo tempo de permanência da criança quer por este ser um local privilegiado de aprendizagem, o que reforça a ideia de que o meio social da criança pode afetar o profundamente o seu padrão alimentar (8). Enquanto modelos, os professores do ensino básico têm o potencial de influenciar o desenvolvimento de hábitos alimentares saudáveis que as crianças podem levar para a idade adulta (5,6,9). Pelo que, é fundamental que os educadores tenham conhecimento sobre nutrição e alimentação para garantir que seus alunos recebam informações precisas (10), deixando claro que os educadores precisam aumentar seu nível de conscientização nutricional (11). A literatura sobre o conhecimento nutricional dos professores é escassa, desse modo pretendeu-se com este estudo avaliar o nível de conhecimento alimentar e nutricional dos professores que lecionam no 1.º ciclo do ensino básico.

## Materiais e métodos

Esta pesquisa consiste num estudo observacional, quantitativo, transversal, para avaliar o grau de conhecimento sobre alimentação e nutrição de professores do 1º ciclo do ensino básico. Os participantes foram recrutados por conveniência no Agrupamento de Escolas Amadora-Oeste localizado na região de Lisboa (Portugal). O recrutamento foi realizado entre abril e maio de 2022, através de um inquérito digital disponibilizado via email para recolha de dados a todos os professores pertencentes ao agrupamento escolar. Responderam ao questionário 81 professores do 1.º ciclo do ensino básico que foram incluídos no estudo. Todos os participantes submeteram seu consentimento informado após receberem informações de que todos os dados seriam mantidos anónimos e utilizados única e exclusivamente para esta investigação. Os

The research questionnaire was divided into three parts: an informed consent section, where the inclusion criterion was acceptance to participate; a section on general characteristics such as gender, age, number of years of teaching, training in nutrition and the inclusion of food and nutrition topics in teaching activities; and a section for assessing knowledge about food and nutrition, where a questionnaire built specifically for this study was used. This questionnaire consisted of nine questions, two of which regarded concepts of a healthy diet, one regarding healthy foods, one about good practices from the point of view of hygiene and food safety, one regarding energy value and for regarding nutritional value of foods. The responses available were "agree", "disagree" and "I am not certain". For scoring purposes, "I am not certain" answers were counted as incorrect. Correct answers received one point and incorrect answers received zero points. Using this classification, the result could vary between 0 and 9 points and the level of knowledge was classified as high (7 points), moderate (4-6 points) or low (3 points).

#### *Statistical Analysis*

Results were expressed as mean (standard deviation, SD) or as relative frequencies. The Pearson Chi-square test was used to compare categorical variables. All analyses were performed using the SPSS statistical package version 27 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with a significance level of 5%.

## **Results**

A sample of 81 teachers was employed in this study, of which 38.3% reported to have been teaching for less than five years, while 61.7% had been teaching for more than five years, therefore, due to these results, it was decided to divide the sample into two groups according to the number of years of teaching.

Table 1 displays the overall characteristics of the participants. Teachers who had been teaching for fewer than five years were younger, with a mean age of 30.6 (2.42) years, compared to those who had been teaching for more than five years, with a mean age of 45.1 (8.55) years ( $p < 0.001$ ). Overall, only 37.0%

princípios orientadores da Declaração de Helsínquia e quaisquer revisões aplicáveis foram seguidos durante a condução do estudo (12).

O questionário de pesquisa foi dividido em três partes: uma seção de consentimento informado, onde o critério de inclusão foi a aceitação em participar; uma seção sobre características gerais como sexo, idade, número de anos de ensino, formação em nutrição e inclusão de temas de alimentação e nutrição nas atividades de ensino; e uma seção para avaliação do conhecimento sobre alimentação e nutrição, onde foi utilizado questionário construído especificamente para este estudo. Este questionário foi composto por nove questões, sendo duas sobre conceitos de dieta saudável, uma sobre alimentos saudáveis, uma sobre boas práticas do ponto de vista da higiene e segurança alimentar, uma sobre valor energético e quatro sobre valor nutricional dos alimentos. As respostas disponíveis foram "concordo", "discordo" e "não tenho a certeza". Para efeitos de pontuação as respostas "não tenho a certeza" foram contabilizadas como incorretas. Respostas corretas receberam 1 ponto e respostas incorretas receberam zero pontos. Usando essa classificação, o resultado poderia variar entre 0 e 9 pontos e o nível de conhecimento foi classificado como alto (7 pontos), moderado (4-6 pontos) ou baixo (3 pontos).

#### *Análise Estatística*

Os resultados foram expressos em média (desvio padrão, DP) ou em frequências relativas. O teste Qui-quadrado de Pearson foi utilizado para comparar variáveis categóricas. Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico SPSS versão 27 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) com nível de significância de 5%.

## **Resultados**

Estudo utilizou uma amostra de 81 professores, dos quais 38,3% lecionavam há cinco anos ou menos e 61,7% lecionavam há mais de cinco anos, portanto, devido a esses resultados, optou-se por dividir a amostra em dois grupos, de acordo com o número de anos de ensino.

A Tabela 1 apresenta as características gerais dos participantes com base nos anos de ensino. Os professores que lecionavam há menos de cinco anos eram mais jovens, com idade média de 30,6 (2,42) anos, enquanto os que lecionavam há mais de cinco anos apresentavam idade média de 45,1 (8,55)



**Table 1** - General characteristics of the participants, according to the years of teaching.  
**Tabela 1** - Características gerais dos participantes, em função dos anos de ensino.

	Total Population / População Total (n=81)	Teaching ≤5 years / Leciona ≤ 5 anos (n=31)	Teaching >5 years / Leciona > 5 anos (n=50)	p-value <sup>a</sup> / Valores de P <sup>a</sup>
Gender / Género, %(n)				
Female / Feminino	72.8 (59)	83.9 (26)	66.0 (33)	0.079
Male / Masculino	27.2 (22)	16.1 (5)	34.0 (17)	
Age, mean (SD), years / Idade, média (DP), Anos	39.6 (9.85)	30.6 (2.42)	45.1 (8.55)	<0.001
During your academic/professional life, did you have any type of training in the field of Nutrition? / No decorrer da sua vida académica/profissional teve algum tipo de formação na área da Nutrição?, %(n)				
Yes - Lectures, Workshop / Sim - Palestras Workshop	35.8 (29)	45.2 (14)	30.0 (15)	
Yes - Postgraduate / Sim - Pós-graduação	1.2 (1)	3.22 (1)	0.0 (0)	0.144
No / Não	63.0 (51)	51.6 (16)	70.0 (35)	
In the current school year, did you include topics on Nutrition and food in your teaching activities? / No presente ano letivo, incluiu temas sobre Nutrição e Alimentação nas suas atividades letivas?, % (n)				
Yes / Sim	79.0 (64)	96.8 (30)	68.0 (34)	0.002
No / Não	21.0 (17)	3.2 (1)	32.0 (16)	

Data expressed as mean (SD) or relative frequency (n). SD, Standard Deviation. <sup>a</sup>P values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson  $\chi^2$  test, with a significance level of  $p < 0.05$  / Dados expressos em média (DP) ou percentagem (n). DP, Desvio Padrão. <sup>a</sup>Valores de P para comparações entre grupos foram testados pelo teste t-Student ou teste de Pearson  $\chi^2$ , com um nível de significância de  $p < 5\%$ .

of the participants reported to have had previously participated in some form of training in the subject (lectures, workshops, or a postgraduate degree). However, 51.6% of teachers with less than five years of experience reported to not have had training in nutrition, compared with 70.0% of teachers with more than five years teaching experience ( $p=0.144$ ). Additionally, it was possible to confirm that 79.0% of the teachers included topics on nutrition and food in their lesson plans. However, a comparison of the two groups revealed that teachers with less teaching experience included these themes more frequently in their lessons (96.8%) than those with more teaching experience (68.0%) ( $p=0.002$ ).

Finally, regarding the knowledge on food and nutrition, Table 2 demonstrates that 30.9% of the participants presented a high level, 44.4% a moderate level, and 24.7% a low level. Those presenting a low level of knowledge were all teachers with more than five years of teaching, which represented 40.0% these group. Among teachers with less than five years of experience 67.7% presented a high degree of knowledge and none presented a low level. ( $p < 0.001$ ).

anos ( $p < 0,001$ ). Globalmente, apenas 37,0% dos participantes reportaram já haver participado em alguma formação sobre o tema (palestras, workshops ou pós-graduação). No entanto, 51,6% dos professores com menos de cinco anos de experiência declararam não ter tido formação em nutrição, em comparação com 70,0% dos professores com mais de cinco anos de experiência de ensino ( $p=0,144$ ). Adicionalmente, foi possível constatar que 79,0% dos professores incluíram temas sobre nutrição e alimentação nos seus planos de aula. No entanto, a comparação entre os dois grupos revelou que os professores com menos experiência de ensino incluíram esses temas com mais frequência nas suas aulas (96,8%) do que aqueles com mais experiência de ensino (68,0%) ( $p=0,002$ ).

Por fim, quanto ao conhecimento em alimentação e nutrição, a Tabela 2 mostrou que 30,9% dos participantes apresentavam nível elevado, 44,4% nível moderado e 24,7% nível baixo. A comparação entre os dois grupos revelou que 32,3% dos docentes com menos de cinco anos de experiência possuíam nível de conhecimento moderado e 67,7% possuíam grau de conhecimento elevado. Nos docentes com mais de

**Table 2** - Evaluation of knowledge about food and nutrition according to the years teaching.  
**Tabela 2** - Avaliação do conhecimento alimentar, dos professores, em função dos anos de ensino.

	Total Population / População Total (n=81)	Teaching ≤5 years / Leciona ≤ 5 anos (n=31)	Teaching >5 years / Leciona > 5 anos (n=50)	p-value <sup>a</sup> / Valores de P <sup>a</sup>
Level of food and nutrition knowledge / Nível de conhecimento em alimentação e nutrição, % (n)				
Low / Baixo, % (n)	24.7 (20)	0.0 (0)	40.0 (20)	
Moderate / Moderado, % (n)	44.4 (36)	32.3 (10)	52.0 (26)	<0.001
High / Elevado, % (n)	30.9 (25)	67.7 (21)	8.0 (4)	

Food and nutrition knowledge categorized into three groups: high ( $\geq 7$  points); medium (4-6 points) and low ( $\leq 3$  points). <sup>a</sup>Comparisons between groups tested by Pearson  $\chi^2$  test, with a significance level of  $p < 0.05$ . Questionnaire in Appendix. / Conhecimento em alimentação e nutrição categorizada em três grupos: elevado ( $\geq 7$  pontos); médio (4-6 pontos) e baixo ( $\leq 3$  pontos). <sup>a</sup>Comparações entre grupos testados pelo teste de  $\chi^2$  de Pearson, com um nível de significância de  $p < 5\%$ . Questionário em Anexo.

We highlight the fact that, globally, 61.7% of the participants answered incorrectly to at least one of the questions related to the nutritional content of foods and the question about their energy value.

## Discussion

This study revealed that, despite covering nutrition-related subjects in their lesson plans, elementary school teachers showed a low degree of training in food and nutrition. Data showed that the level of knowledge about food and nutrition that most teachers had was moderate, however, teachers with less teaching experience had a higher degree of understanding of these topics, which is in agreement with the literature (10,12) and is justified by the professors' characteristics, such as prior experience or expertise, motivation, and interest, in addition to the accessibility of thorough instructional resources and teacher preparation (13). Time restrictions and professional demands are the main barriers reported regarding this form of training, thus supporting the teacher's difficulty in the acquisition of nutritional education (14). Additionally, questions related to nutritional topics, such as the energy value or nutritional content of foods, represented the greatest difficulties in response for teachers, thus identifying the greatest gaps in their knowledge and possible areas of training needs for these professionals. In Portugal, the academic training of primary school teachers does not include training in food and nutrition in its syllabus (15), which may explain some of the results obtained.

**cinco anos de experiência, 40,0% apresentaram baixo nível de conhecimento sobre alimentação e nutrição, 52,0% nível moderado e 8,00% nível alto ( $p < 0,001$ ).**

**Destaca-se o fato de que, globalmente, 61,7% dos participantes responderam incorretamente a pelo menos uma das questões relacionadas ao conteúdo nutricional dos alimentos e à questão sobre o seu valor energético.**

## Discussão

**Este estudo revelou que, apesar de abordarem assuntos relacionados à nutrição em seus planos de aula, os professores do ensino básico apresentaram baixo grau de formação em alimentação e nutrição. Os dados mostraram que o nível de conhecimento sobre alimentação e nutrição que a maioria dos professores apresentou foi moderado, porém os professores com menos experiência de ensino tiveram um maior grau de compreensão desses tópicos, o que está de acordo com a literatura (10,12) e são justificados pelas características dos professores, como experiência ou especialização prévia, motivação e interesse, além da acessibilidade de recursos instrucionais completos e preparação do professor (13). Restrições de tempo e demandas profissionais são as principais barreiras relatadas para este tipo de treino, corroborando assim a dificuldade do professor em adquirir educação nutricional (14). Adicionalmente, foram as questões relacionadas com temas nutricionais, como o valor energético ou o conteúdo nutricional dos alimentos que representaram as maiores dificuldades de resposta dos professores, identificando assim as maiores lacunas no seu conhecimento e permitindo**

Regardless of their level of training, most of the participants in this study reported teaching classes on nutrition and food. Identical results were reported by Falkenbach et al. (16) evaluating the inclusion of food-related themes in preschoolers, which demonstrated that the difficulties and facilitations encountered by teachers had a substantial influence on the implementation of school-based nutrition interventions. Additionally, a study conducted by Rosário et al. (17) in Portugal examining the effects of a program using classroom teachers as dedicated interventionists to deliver obesity prevention interventions found that the beneficial effects of an educational program produced significant effects on child overweight prevention. Albuquerque et al. (18) conducted a study on teachers' perception on food and nutritional education in a school setting. Teachers expressed a desire to study the topic but also a fear that they would not be able to teach something they were unfamiliar with effectively. Most teachers carried out nutrition education activities ostensibly based on common beliefs and sources, due to lack of training, which can encourage students to consume inappropriate foods, making the need for training in nutrition education for teachers clear (13,18).

In this work, elementary school teachers demonstrated a moderate to low level of understanding of food and nutrition. These results are supported by the work of Parlak et al. (19), who assessed 280 teachers' nutritional knowledge and found that more than half of the teachers had a moderate level of nutritional knowledge. Bezerra et al. (20) came to similar conclusions, reporting a moderate score regarding teachers' nutritional knowledge. Significant gaps in teachers' knowledge of nutrition-related subjects were found in a recent study evaluating their nutritional knowledge, highlighting the importance of conducting training exercises on this topic to raise awareness, boost teachers' confidence, and enable them to promote healthy lifestyles in their students (5). Literature shows that improving food and nutrition literacy can improve eating behaviors, food and nutrition knowledge, self-efficacy in these areas, and diet quality (20), thus complying with the WHO recommendations stating the inclusion of both dietary and physical activity components in the school curriculum, taught by qualified teachers (21).

identificar possíveis focos de necessidade em formação para estes profissionais. A formação académica dos professores do 1º ciclo do ensino básico, em Portugal, não contempla nos seus conteúdos programáticos formação em alimentação e nutrição (15), o que pode justificar alguns dos resultados obtidos.

Independentemente do nível de formação, a maioria dos participantes deste estudo relatou ministrar aulas sobre nutrição e alimentação. Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Falkenbach et al. (16) avaliando a inclusão de temas relacionados à alimentação em pré-escolares, o que demonstrou que as dificuldades e facilitadores enfrentados pelos professores tiveram uma influência substancial na implementação de intervenções nutricionais nas escolas. Além disso, Rosário et al. (17) examinou os efeitos de um programa que designou professores de sala de aula como interventores dedicados para realizar intervenções de prevenção da obesidade em um estudo realizado em Portugal, descobrindo que os efeitos benéficos de um programa educacional produziram efeitos significativos na prevenção do sobrepeso infantil. Albuquerque et al. (18) realizaram um estudo sobre a percepção de professores sobre educação alimentar e nutricional em ambiente escolar. Os professores expressaram o desejo de estudar o tema, mas também o medo de não conseguirem ensinar efetivamente algo que não conheciam. A maioria dos professores realizava atividades de educação nutricional ostensivamente baseadas em crenças e fontes comuns, devido à falta de formação, o que pode estimular os alunos a consumir alimentos inadequados, tornando-se clara a necessidade de formação em educação nutricional para os professores (13,18).

Neste trabalho, os professores do 1º ciclo ensino básico demonstraram um grau de compreensão sobre alimentação e nutrição com um nível moderado a baixo. Estes resultados são suportados pelo trabalho de Parlak et al. (19), que avaliaram o conhecimento nutricional de 280 professores e constataram que mais da metade dos professores apresentava um nível moderado de conhecimento nutricional. Bezerra e cols. (20) chegaram a conclusões semelhantes encontrando uma pontuação moderada em relação ao conhecimento nutricional dos professores. Lacunas significativas no conhecimento dos professores sobre assuntos relacionados à nutrição foram encontradas em um estudo recente que avaliou seus conhecimentos nutricionais, destacando a importância de realizar exercícios de treinamento sobre o tema para aumentar a conscientização, aumentar a confiança dos professores e capacitá-los para promover estilos de vida saudáveis em

Teachers with five or fewer years of teaching experience were younger, more knowledgeable about food and nutrition, and more likely to incorporate these topics into lesson plans. Shimabukuro et al. (22) reported that college-educated educators under the age of 38 had greater knowledge, which is consistent with our findings. Teachers' ages are known to be one of the major determinants of their interest in food and nutrition topics, as well as their nutritional knowledge, with younger teachers being more aware of issues connected to food and health (23,24). In contrast, the analysis of Fernandez et al. (25) of 288 teachers revealed a strong relationship between age and food group knowledge, with teachers older than 33 years exhibiting greater performance.

This study's innovative nature is demonstrated by being the first to compare the duration of the educators' teaching careers to the depth of their understanding of nutrition and food. However, several limitations must be considered, such as the use of a small convenience sample collected only in the Lisbon area and thus not representative of the population, as well as the lack of a validated questionnaire.

## **Conclusion**

This study showed that the surveyed elementary school teachers lack training in food and nutrition even though this is a subject that most teachers discuss. In this sample, teachers with fewer years of experience tended to know more about food and nutrition than those with more years of experience.

Our findings highlight the need for more research in this area, given the enormous influence elementary school teachers have on children's behavior and attitudes.

seus alunos (5). A literatura mostra que melhorar a alfabetização alimentar e nutricional pode melhorar os comportamentos alimentares, o conhecimento alimentar e nutricional, a autoeficácia nessas áreas e a qualidade da dieta (20), cumprindo assim as recomendações da OMS de inclusão de componentes tanto da alimentação quanto da atividade física no currículo escolar, ministrados por professores qualificados (21).

Os professores com cinco anos ou menos de experiência de ensino eram mais jovens, mais informados sobre alimentação e nutrição e mais propensos a incorporar esses tópicos nos planos de aula. Shimabukuro et al. (22) relataram que educadores com formação superior com menos de 38 anos tinham maior conhecimento, o que é consistente com nossos achados. Sabe-se que a idade dos professores é um dos principais determinantes de seu interesse por tópicos de alimentação e nutrição, bem como de seu conhecimento nutricional, sendo os professores mais jovens mais conscientes de questões relacionadas à alimentação e saúde (23, 24). Em oposição a isso, a análise de Fernandez et al. (25) de 288 professores revelou uma forte relação entre idade e conhecimento do grupo de alimentos, com professores com mais de 33 anos exibindo melhor desempenho.

O caráter inovador deste estudo demonstra-se por ter sido o primeiro a comparar a duração da carreira docente dos educadores com a profundidade de sua compreensão sobre nutrição e alimentação. Existem, no entanto, várias limitações que devem ser tidas em consideração, como a utilização de uma pequena amostra de conveniência que apenas foi recolhida na área de Lisboa e não é representativa da população, bem como a falta de um questionário validado.

## **Conclusão**

Este estudo mostra que professores do 1º ciclo do ensino básico carecem de formação em alimentação e nutrição, embora estes temas sejam abordados pela maioria dos professores. Nesta amostra, professores mais jovens e com menos anos de experiência tendem a saber mais sobre alimentação e nutrição do que aqueles com mais anos de experiência.

Estes resultados reforçam a necessidade de mais pesquisa nesta área, dada a enorme influência que os professores do ensino fundamental têm sobre o comportamento e as atitudes das crianças.

### **Author contributions**

EA, CR and CFP, conceptualization and study design; AP, experimental implementation; AP and EA, data analysis; AP, CR and EA, drafting, editing and reviewing; AP, figures; EA, supervision and final writing.

### **Conflict of Interests**

The authors involved in this project confirm that there is no conflict of interest.

### **Contribuição dos autores**

EA, CR e CFP, conceção e desenho do estudo; AP, implementação experimental; AP e EA, análise de dados; AP, CR e EA, redação, edição e revisão; AP, figuras; EA, supervisão e redação final.

### **Conflitos de interesse**

Os autores envolvidos neste projeto, confirmam não existir conflito de interesses.

## References / Referências

1. Weihrauch-Blüher, S., & Wiegand, S. Risk Factors and Implications of Childhood Obesity. (2018). *Current Obesity Reports*, 7(4), 254–259. <https://doi.org/10.1007/S13679-018-0320-0>.
2. Sanyaolu, A., Okorie, C., Qi, X., Locke, J., & Rehman, S. (2019). Childhood and Adolescent Obesity in the United States: A Public Health Concern. *Global pediatric health*, 6, 2333794X19891305. <https://doi.org/10.1177/2333794X19891305>
3. Frade, F., Carteiro, D., Pereira, F., Marques, J., & Frade, J. (2020). Prevalence of Childhood Obesity in Portugal: A Narrative Review of the Literature. *Portuguese Journal of Public Health*, 38(2), 119–128. <https://doi.org/10.1159/000511792>.
4. Gregório, M. J., & Karger, S. (2018). Obesity as a Major Public Health Problem in Portugal: Achievements and Challenges. *Portuguese Journal of Public Health*, 36(3), I–II. <https://doi.org/10.1159/000502305>.
5. Katsagoni, C. N., Apostolou, A., Georgoulis, M., Psarra, G., Bathrellou, E., Filippou, C., Panagiotakos, D. B., & Sidossis, L. S. (2019). Schoolteachers' Nutrition Knowledge, Beliefs, and Attitudes Before and After an E-Learning Program. *Journal of nutrition education and behavior*, 51(9), 1088–1098. <https://doi.org/10.1016/j.jneb.2019.07.001>
6. Scaglioni, S., de Cosmi, V., Ciappolino, V., Parazzini, F., Brambilla, P., & Agostoni, C. (2018). Factors Influencing Children's Eating Behaviours. *Nutrients*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/NU10060706>.
7. Love, P., Booth, A., Margerison, C., Nowson, C., & Grimes, C. (2020). Food and nutrition education opportunities within Australian primary schools. *Health Promotion International*, 35(6), 1291–1301. <https://doi.org/10.1093/HEAPRO/DAZ132>.
8. Jung, T., Huang, J., Eagan, L., & Oldenburg, D. (2019). Influence of school-based nutrition education program on healthy eating literacy and healthy food choice among primary school children. *International Journal of Health Promotion and Education*. 57(2):67–81. doi: 10.1080/14635240.2018.1552177.
9. Dudley, D. A., Cotton, W. G., & Peralta, L. R. (2015). Teaching approaches and strategies that promote healthy eating in primary school children: a systematic review and meta-analysis. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*, 12, 28. <https://doi.org/10.1186/s12966-015-0182-8>
10. Follong, B. M., Prieto-Rodríguez, E., Miller, A., Collins, C. E., & Bucher, T. (2022). Evaluating an integrated nutrition and mathematics curriculum: primary school teachers' and students' experiences. *Public health nutrition*, 25(8), 1–12. Advance online publication. <https://doi.org/10.1017/S1368980022000386>
11. Wang, S. J., Wang, T. T., & Wang, J. B. (2020). Nutritional knowledge, attitudes and dietary behaviors of teachers and students in a medical college in Beijing and their influencing factors. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences*, 52 (5), 881–885. <https://doi.org/10.19723/J.ISSN.1671-167X.2020.05.014>.
12. World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
13. Pérez-Rodrigo, C & Aranceta, J. (2003). Nutrition education in schools: experiences and challenges. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, S82–S85.
14. Hall, E., Chai, W., & Albrecht, J.A. (2016). A Qualitative Phenomenological Exploration of Teachers' Experience with Nutrition Education. *American Journal of Health Education*, 47:3, 136-148, DOI: 10.1080/19325037.2016.1157532.
15. Decreto-Lei n.º 79/2014, de 14 de maio. Decreto-Lei n.º 79/2014 de 14 de Maio do Ministério da Educação e Ciência. Diário da República: I Série, n.º 92 (2014). Available at: <http://www.dre.pt>. Consulted 15 jun 2023.
16. Falkenbach, D., Freitas D'ávila, H., & Daniel De Mello, E. (2018). Knowledge, Attitudes and Practices of Primary School Teachers on Nutrition and Food. *Journal of Nutrology*, 11, 21–29. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1646942>.
17. Rosário, R., Oliveira, B., Araújo, A., Lopes, O., Padrão, P., Moreira, A., Teixeira, V., Barros, R., Pereira, B., & Moreira, P. (2012). The impact of an intervention taught by trained teachers on childhood overweight. *International journal of environmental research and public health*, 9(4):1355-67. doi: 10.3390/ijerph9041355.
18. Albuquerque, A.G., Pontes, C.M., & Osório, M.M. (2013). Knowledge of educators and dieticians on food and nutrition education in the school environment. *Revista de Nutrição*, 26(03):291–300.
19. Parlak, M.E., & Ener, D. (2023). Nutritional knowledge levels and food preferences of teachers. *Medicine Science*, 12(1):1-8. <http://dx.doi.org/10.5455/medscience.2022.10.217>.
20. Bezerra, K.F.; Capuchinho, L.C.F.M.; & Pinho, L. (2015). Conhecimento e abordagem sobre alimentação saudável por professores do ensino fundamental. *Demetra*, 10(1); 119-131. <http://dx.doi.org/10.12957/demetra.2015.13182>.
21. World Health Organization. Regional Office for Europe. (2006). Food and nutrition policy for schools : a tool for the development of school nutrition programmes in the European Region. Copenhagen : WHO Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/107797>
22. Shimabukuro, E.E., Oliveira, M., & Taddei, J. A. (2008). Conhecimentos de educadores de creches sobre alimentação infantil. *Revista Paulista De Pediatria*, 26(3), 231–237. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822008000300006>.
23. Liu, H.; Xu, X.; Liu, D.; Rao, Y.; Reis, C.; Sharma, M.; Yuan, J.; Chen, Y.; & Zhao, Y. (2018). Nutrition-Related Knowledge, Attitudes, and Practices (KAP) among Kindergarten Teachers in Chongqing, China: A Cross-Sectional Survey. *International journal of environmental research and public health*, 15, 615. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040615>.
24. Habib, M.A., Alam, M.R., Rahman, T., Chowdhury, A.I., & Shill, L.C. (2023). Knowledge, attitudes, and practices (KAP) of nutrition among school teachers in Bangladesh: A cross-sectional study. *PLoS One*, 18(3): e0283530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283530>.
25. Fernandez, P.M., & Silva, D.O. (2008). A description of the conceptual notions about food groups by 1st to 4th grade teachers: the necessity to review the concepts. *Ciência & Educação (Bauru)*, 14(03):4451–4466.

### Appendix / Anexo

Questions and correct responses in assessment of knowledge about food and nutrition /  
 Perguntas e respostas correctas na avaliação dos conhecimentos sobre alimentação e nutrição

Question / Questão	Answer / Resposta		
	I agree / Concorda	I disagree / Discorda	I am not certain / Não tenho a certeza
A healthy diet is a diet rich in different foods from the food wheel / Uma dieta saudável é uma dieta rica em diferentes alimentos da roda dos alimentos.	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos	0 points / 0 pontos
A healthy food is a microbiologically tested food / Um alimento saudável é um alimento microbiologicamente testado.	0 points / 0 pontos	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos
Washed and packed ready-to-eat vegetables are healthy foods / Vegetais lavados e embalados prontos a comer são alimentos saudáveis.	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos	0 points / 0 pontos
1 g of fat provides 9 kcal / 1 g de gordura fornece 9 kcal.	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos	0 points / 0 pontos
Meat contains a high content of soluble fiber / A carne contém elevado teor em fibra solúvel.	0 points / 0 pontos	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos
Olive oil is a fat rich in cholesterol / O azeite é uma gordura rica em colesterol.	0 points / 0 pontos	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos
According to experts, we should reduce our consumption of saturated fat / Segundo os especialistas, devemos reduzir o consumo de gordura saturada.	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos	0 points / 0 pontos
Some foods contain fat but no cholesterol / Alguns alimentos contêm gordura, mas não contêm colesterol.	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos	0 points / 0 pontos
There is more calcium in a glass of full-fat milk than in a glass of skimmed milk / Existe mais cálcio num copo de leite gordo do que num copo de leite magro.	0 points / 0 pontos	1 point / 1 ponto	0 points / 0 pontos

## Addressing the digital divide: who is being left behind in the evaluation of e-Health interventions to improve medication adherence?

## Abordando a iniquidade digital: quem está a ser deixado para trás na avaliação das intervenções de e-Health para melhorar a adesão aos medicamentos?

João Gregório <sup>1</sup> , Tiago Maricoto <sup>2</sup> , Paulo A.S. Moreira <sup>3</sup> , Fátima Roque <sup>4</sup> , Jaime Correia-de-Sousa <sup>5</sup> , Maria Teresa Herdeiro <sup>6</sup> , Isabel F Almeida <sup>7</sup> , Ioanna Tsiligiann <sup>8</sup> , Tamas Agh <sup>9</sup> , Cristina Jácome <sup>10</sup> 

**Keywords:** Medication adherence, e-Health evaluation, digital divide, health inequities, digital health

**Palavras-chave:** Adesão aos medicamentos, avaliação em e-Health, clivagem digital, iniquidades em saúde, saúde digital

### To Cite:

Gregório, J. et al. (2023) Addressing the digital divide: who is being left behind in the evaluation of e-Health interventions to improve medication adherence? *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 93-105.

 [10.19277/bbr.20.1.315](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.315)

<sup>1</sup> CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Aveiro Healthcare Centre, Aradas Family Health Unit, Aveiro, Portugal; and Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> Instituto de Psicologia e Ciências da Educação, Universidade Lusíada – Norte, Porto, Portugal; and Centro de Investigação em Psicologia para o Desenvolvimento(CIPD), Porto, Portugal

<sup>4</sup> Research Unit for Inland Development, Polytechnic of Guarda (UDI-IPG), Guarda, Portugal

<sup>5</sup> Life and Health Sciences Research Institute. School of Medicine. University of Minho. Braga, Portugal; and ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga, Portugal

<sup>6</sup> Institute of Biomedicine (iBiMED) and Department of Medical Sciences, University of Aveiro, Aveiro, Portugal

<sup>7</sup> UCIBIO, REQUIMTE, Med Tech, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Drug Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal; and Associate Laboratory i4HB - Institute for Health and Bioeconomy, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>8</sup> Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, Crete, Greece

<sup>9</sup> Syreon Research Institute, Budapest, Hungary; and Center for Health Technology Assessment and Pharmacoeconomic Research, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>10</sup> CINTESIS@RISE, MEDCIDS, Faculty of Medicine of the University of Porto, Porto, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[joao.gregorio@ulusofona.pt](mailto:joao.gregorio@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 18/04/2023  
 Accepted / Aceite: 12/07/2023

### Abstract

The implementation of e-Health initiatives aimed at improving medication adherence has shown limited success. This may be attributed to inadequate participant selection in evaluation studies. The objective of this evidence-based commentary is to examine the inclusion criteria of participants in e-Health interventions for medication adherence. In May 2021, we identified two systematic reviews, encompassing a total of 44 randomized controlled trials (RCTs) evaluating e-Health interventions for medication adherence. These interventions were aimed to diabetes (n=10), immunosuppressive therapy (n=6), and cardiovascular diseases (n=29). Participants in interventions utilizing digital apps had a lower mean age compared to those using telephones (53.9 ± 7.5 years vs. 63.4 ± 6.3 years). Most papers (91.0%) did not report participants' level of digital literacy, and educational background was only mentioned in 57.8% of the studies. Exclusion criteria associated with age, education, health conditions, were identified in the assessment of e-Health interventions, while digital literacy was seldom assessed. It is recommended incorporating the assessment and reporting of digital literacy into participant selection procedures in RCTs to address the digital divide and obtain more accurate information regarding the efficacy of e-Health interventions.

### Resumo

A implementação de intervenções e-Health destinadas à adesão à medicação tem tido sucesso limitado. Isto pode ser atribuído à seleção inadequada dos participantes nos estudos de avaliação. O objetivo deste comentário é examinar os critérios de inclusão dos participantes neste tipo de intervenções. Em maio de 2021, identificámos duas revisões sistemáticas recentes avaliando intervenções de e-Health para adesão à medicação, num total de 44 ensaios clínicos randomizados (RCTs). Estas intervenções abordaram a diabetes (n=10), terapia imunossupressora (n=6) e doenças cardiovasculares (n=29). Os participantes em intervenções que utilizaram aplicações digitais tinham uma idade média mais baixa do que os que utilizaram telefones (53,9 ± 7,5 anos vs. 63,4 ± 6,3 anos). A maioria dos artigos (91,0%) não referiu o nível de literacia digital dos participantes e a formação académica apenas foi mencionada em 57,8% dos estudos. Registam-se critérios de exclusão associados à idade, educação, e condições de saúde, enquanto a literacia digital raramente foi avaliada, mas utilizada como critério de exclusão. Recomenda-se a incorporação da avaliação e da comunicação da literacia digital nos procedimentos de seleção dos participantes de intervenções em e-Health, a fim de abordar a 'clivagem' digital e obter informações mais precisas sobre a eficácia dessas intervenções.



## Introduction

With the expansion of life expectancy and better health care, an increase in the incidence of chronic diseases and multi-morbidity has been documented worldwide (1). Addressing multi-morbidity requires a multidisciplinary response, often involving lifestyle modifications combined with lifelong medication use and its associated complications (2). Among the major challenges faced by healthcare professionals, managing medication non-adherence stands out, as approximately 50% of patients with chronic diseases do not fully adhere to their therapeutic regimen (3). In Europe, non-adherence contributes to nearly 200,000 premature deaths and costs 125€ billion per year in avoidable hospitalizations, emergency care, and outpatient visits (4). In the United States, it is estimated that medication non-adherence causes approximately 125,000 deaths, accounts for 10% of hospitalizations, and results in healthcare system expenditures ranging from \$100 billion to \$289 billion annually (5). Due to this huge impact, medication adherence has been identified as a key priority in health policies and research agendas (6).

The term 'e-Health' encompasses the broad use of information and communication technology to enhance healthcare at local, regional, and global levels (7). Mobile health (m-Health) and wearable devices (such as smartwatches) are examples of e-Health technologies employed in medication adherence research, offering feasible integration into patients' daily lives (8,9). These e-Health interventions have the potential to empower patients in identifying and managing unintentional non-adherence and facilitate communication with healthcare professionals for shared decision-making (8,10).

However, the current evidence regarding the use of e-Health interventions to tackle medication non-adherence is diverse (11). Recent systematic reviews showed that the available evidence of the impact of e-Health solutions on medication non-adherence remains inconclusive (8,11–14). A number of factors might contribute to this situation, for example, the fact that most e-Health interventions propose one-size-fits-all solutions for distinct nonadherence patterns (erratic; unwitting; intelligent) (3). Another potential contributing factor is the inclusion of specific patient groups in the evaluation of e-Health interventions targeting medication adherence, which may not accurately represent the diverse spectrum of real-world patients. This concern has also been raised in other areas of e-Health research (15,16). Individuals

## Introdução

Com a expansão da esperança de vida e melhores cuidados de saúde, a incidência de doenças crônicas e da multimorbilidade tem aumentado em todo o mundo (1). Abordar a multimorbilidade requer uma resposta multidisciplinar, que muitas vezes envolve mudanças no estilo de vida combinadas com o uso de medicação de uso crônico, com as complicações associadas (2). A gestão da não adesão aos medicamentos é um dos maiores desafios enfrentados pelos profissionais de saúde, uma vez que cerca de 50% dos pacientes com doenças crônicas não aderem na totalidade ao seu regime terapêutico (3). Só na Europa, a não adesão à terapêutica medicamentosa contribui para quase 200.000 mortes prematuras e custa 125 mil milhões de euros por ano em hospitalizações evitáveis, cuidados de emergência e cuidados extra em ambulatório (4). Nos EUA, estima-se que esta falta de adesão provoque quase 125.000 mortes, 10% de hospitalizações e 100 a 289 mil milhões de dólares de despesas do sistema de saúde por ano (5). Devido a este enorme impacto, melhorar a adesão aos medicamentos tem sido apontado como uma prioridade fundamental tanto nas políticas de saúde como nas agendas de investigação (6).

e-Health é um termo amplo que se refere à utilização das tecnologias da informação e comunicação para melhorar os cuidados de saúde a nível local, regional e mundial (7). Saúde móvel (m-Health), e utilização de biossensores em dispositivos (ex: smartwatches) são exemplos de tecnologias de e-Health utilizadas na investigação da adesão a medicamentos que têm viabilidade para integrar a vida quotidiana dos pacientes (8,9). As intervenções de e-Health são apelativas, uma vez que poderão capacitar os pacientes na deteção e gestão da não adesão involuntária e para apoio à comunicação com profissionais de saúde e à tomada de decisões em conjunto (8,10).

No entanto, a evidência atual sobre o potencial das intervenções de e-Health para combater a não adesão aos medicamentos é muito diversa (11). Revisões sistemáticas recentes mostraram que a evidência disponível do impacto das soluções de e-Health na não adesão aos medicamentos continua a ser inconclusiva (8,11-14). Vários fatores podem contribuir para esta indefinição, por exemplo, o facto de a maioria das intervenções de e-Health propor soluções únicas para padrões de não adesão completamente distintos (erráticos; involuntários; inteligentes) (3). Outro fator explicativo pode estar ligado à inclusão de grupos específicos de pacientes

with low health literacy are less prone to use e-Health tools and generally present worse health outcomes (17). Skills for using e-Health technologies depend on several factors, and some more vulnerable groups have been identified, such as those with lower literacy and elderly citizens (18).

The recognition that there is much to improve in this field, mainly due to the expected exponential growth of innovative solutions in the coming years, has led a group of researchers and professionals interested in all aspects of medication adherence to form a COST action (European Network to Advance Best practices and technology on medication adherence -ENABLE, COST Action 19132). One of the aims of this action is to improve the knowledge on the application of novel technologies for medication adherence, their clinical applications, and policy measures supporting their implementation across Europe (19). Thus, the main goal of this paper is to contribute to the debate by providing an evidence-based commentary that examines the characteristics of participants enrolled in e-Health interventions focused on medication adherence and discuss the factors that can impact the evaluation of these interventions. By doing so, we aim to highlight how these factors can worsen inequities in e-Health for medication adherence. By doing so, we aim to contribute to the improvement of future research endeavors in this area.

## Materials and Methods

To achieve the main aim of this paper, and considering the nature of this commentary, the authors searched for recent systematic reviews of randomized control trials concerning e-Health and medication adherence published in the Journal of Medical Internet Research (JMIR), a leading journal in the field of digital medicine and health. Determining this strategy was the research team's perception of JMIR's importance. In fact, the impact factor of this journal is 7,077 (source: JCR, 2021), being in the first quartile of the "Health Care Sciences and Services" category, and the first that also belongs to the "Medical Informatics" category. In this category, it is the most cited journal.

na avaliação de intervenções de e-Health para melhorar a adesão aos medicamentos, que não são representativos do espectro de pacientes existente no mundo real. Esta preocupação já foi também levantada noutras áreas da investigação em e-Health (15,16). Os indivíduos com baixa literacia em saúde são menos propensos a utilizar ferramentas de e-Health e geralmente apresentam piores resultados de saúde (17). As competências para a utilização de tecnologias de e-Health dependem de vários fatores, tendo sido identificados alguns grupos mais vulneráveis, tais como aqueles com menor literacia e os cidadãos idosos (18).

O reconhecimento de que há muito a melhorar neste campo, que deverá sofrer um crescimento exponencial de soluções inovadoras nos próximos anos, levou um grupo de investigadores e profissionais interessados em todos os aspetos da adesão aos medicamentos a formar uma acção COST ('European Network to Advance Best practices and technology on medication adherence' -ENABLE, COST Action 19132). Entre os objetivos desta ação está a melhoria do conhecimento sobre a aplicação de novas tecnologias dirigidas à adesão aos medicamentos, as suas aplicações clínicas e as medidas políticas que apoiam a sua implementação em toda a Europa (19). Assim, o principal objetivo deste artigo é contribuir para o debate, fornecendo um comentário baseado na evidência que examina as características dos participantes inscritos em intervenções e-health para adesão à medicação, e discutir os factores que podem ter impacto na avaliação destas intervenções. Ao fazê-lo, pretendemos salientar como estes factores podem agravar as desigualdades em e-Health para a adesão à medicação, contribuindo para a melhoria da investigação nesta área.

## Materiais e métodos

Para atingir o objectivo principal do presente documento, e tendo em conta a natureza deste comentário, os autores procuraram revisões sistemáticas recentes de ensaios clínicos controlados e aleatórios, relativos a intervenções de e-Health para adesão a medicamentos, publicados no 'Journal of Medical Internet Research (JMIR)', uma revista líder no domínio da medicina digital e da saúde. Determinante para esta estratégia foi a percepção da equipa de investigação sobre a importância da JMIR. De facto, o factor de impacto desta revista é de 7,077 (fonte: JCR, 2021), estando no primeiro quartil da categoria

### Search strategy

The search was performed in May 2021, and systematic literature reviews were selected if: published after 2020; included only randomized controlled trials; and described e-Health interventions in accordance with the e-Health definition of Eysenbach, that is "health services and information delivered or enhanced through the Internet and related technologies"(7). Systematic reviews were excluded if they reported papers that were population-specific.

### Data analysis

After selecting the relevant systematic literature reviews, the individual studies supporting those reviews were collected. To ensure a comprehensive extraction of data from each article, we utilized a purpose-built form. This form included the main author's last name and year of publication, country, health condition, interventions, eligibility criteria, sample size, and participants characteristics (age, gender, education, digital literacy, occupation, income, civil status, race). A team of seven reviewers (JG, TM, PM, JCS, MTH, FR, CJ) was responsible for extracting data from the selected articles, while two reviewers (JG and CJ) harmonized the extracted data to ensure consistency. Any discrepancies or disagreements among the reviewers regarding the collected data were discussed and resolved in monthly team meetings involving all authors.

## Results

### Collected papers

Two systematic reviews fulfilled the eligibility criteria: one with 21 papers and the other with 24 (13,14). These two reviews collectively analyzed a total of 45 papers, corresponding to 44 unique studies (20–63). All studies were randomized controlled trials and published between 2003 and 2020 ([Supplementary material - Table S1](#)). The majority of the studies (n=21) were conducted in the United States, followed by Western European countries (n=14). These studies addressed mostly e-Health interventions for patients with hypertension (n=12), diabetes (n=10) and with other cardiac conditions (n=8).

"Health Care Sciences and Services", e a primeira que também pertence à categoria "Medical Informatics". Nesta categoria, é a revista mais citada.

### Estratégia de pesquisa

A pesquisa foi realizada em Maio de 2021, e foram seleccionadas revisões sistemáticas de literatura que cumprissem os seguintes critérios: publicadas após 2020; incluíssem apenas ensaios clínicos controlados aleatorizados; e descrevessem intervenções de e-Health de acordo com a definição de e-Health de Eysenbach, ou seja, "serviços de saúde e informação fornecida ou melhorada através da Internet e tecnologias relacionadas" (7). Foram excluídas as revisões sistemáticas que apresentavam artigos específicos para uma determinada população.

### Análise de dados

Após a selecção das revisões sistemáticas relevantes, foram recolhidos os estudos individuais que constavam dessas revisões. Para extrair os dados de cada artigo foi utilizado um formulário padronizado que incluía o apelido do autor principal e ano de publicação, país, estado de saúde, intervenções, critérios de elegibilidade, tamanho da amostra e características dos participantes (idade, sexo, educação, literacia digital, ocupação, rendimento, estado civil, raça). Uma equipa de sete revisores (JG, TM, PM, JCS, MTH, FR, CJ) foi responsável pela extração de dados dos artigos seleccionados, enquanto dois revisores (JG e CJ) harmonizaram os dados extraídos para garantir a sua consistência. Quaisquer discrepâncias entre os revisores relativamente aos dados recolhidos foram discutidas e resolvidas em reuniões de equipa mensais envolvendo todos os autores.

## Resultados

### Artigos recolhidos

Duas revisões sistemáticas preenchem os critérios de elegibilidade: uma com 21 artigos e outra com 24 artigos (13,14). Estas duas revisões analisaram um total de 45 artigos, reportando 44 estudos diferentes (20-63). Todos os estudos foram ensaios clínicos controlados aleatorizados e publicados entre 2003 e 2020 ([Material suplementar - Tabela S1](#)). Houve uma grande representação de estudos realizados nos EUA (n=21) e em países da Europa Ocidental (n=14). Estes estudos abordaram principalmente intervenções de e-Health para doentes com hipertensão (n=12), diabetes (n=10) e com outras condições cardíacas (n=8).

### *Participants' characteristics – inclusion and exclusion criteria*

Original studies used sociodemographic-, clinical-, and literacy-related eligibility criteria to select participants. In total, studies included 47,501 participants (samples between 37 and 21,752), with a mean age of  $60 \pm 10$  years. Inclusion of both men and women ( $n=42$ ) with 18 years old or over ( $n=25$ ) were the most common criteria. The distribution of male and female participants was relatively balanced, with females accounting for 47% and males for 53% of the total. Nine studies used other minimum age cut-offs (i.e., 7, 21, 40, 50, 60, and 65 years of age) and three studies even defined maximum cut-offs (i.e.,  $\geq 75$ , and  $\geq 80$  years of age). Apart from age, having specific medical conditions ( $n=38$ ) or a specific medicine/groups of medicines prescribed ( $n=28$ ) were the most frequent inclusion criteria. Other inclusion criteria were sub-optimum medication adherence ( $n=6$ ), being followed up in a certain healthcare setting ( $n=8$ ), and being able to self-manage medication at home ( $n=6$ ).

With regard to literacy, criteria such as fluency in a specific language ( $n=12$ ) and proficiency in using or accessing a smartphone ( $n=13$ ), internet ( $n=8$ ) or text messages ( $n=7$ ) were used. Only 18 studies reported the educational levels of participants, and although various classifications were employed, the majority of participants had attained at least a higher education or completed more than 12 years of schooling. Fourteen studies provided information on ethnicity, including 12 from the USA, one from South America, and one from Germany. Across these studies, white participants were generally overrepresented, comprising 31% to 95% of the enrolled individuals. Marital status was reported in only six studies, with married participants constituting approximately half of the recruited individuals (ranging from 59% to 66%), except for one study, which reported a lower frequency (35%).

Exclusion criteria were mostly related to perceived difficulties with the technologies, either from cognitive and mental impairment (e.g., dementia; depression) ( $n=10$ ); physical inability or other biological impairment (e.g., visual impairment) ( $n=6$ ); specific medical treatments ( $n=6$ ); living in an institution ( $n=6$ ); participation in other studies ( $n=3$ ) and low literacy (e.g., language and digital barriers, no other contact available) ( $n=3$ ).

### *Características dos participantes - critérios de inclusão e exclusão*

Os estudos originais utilizaram critérios de elegibilidade sociodemográficos, clínicos e de alfabetização para seleccionar os participantes. No total, os estudos incluíram 47.501 participantes (amostras entre 37 e 21.752), com uma idade média de  $60 \pm 10$  anos. A inclusão tanto de homens como de mulheres ( $n=42$ ) com 18 anos ou mais ( $n=25$ ) encontrava-se entre os critérios mais comuns. No entanto, 9 estudos utilizaram outros cortes de idade mínima (por exemplo: 7, 21, 40, 50, 60, e 65 anos de idade) e 3 estudos definiram mesmo cortes máximos (por exemplo:  $\geq 75$ , e  $\geq 80$  anos de idade). Para além da idade, ter condições médicas específicas ( $n=38$ ) ou um medicamento/grupo específico de medicamentos prescritos ( $n=28$ ) foram os critérios de inclusão mais frequentes. Outros critérios de inclusão foram adesão a medicamentos subóptima ( $n=6$ ), o acompanhamento num determinado contexto de cuidados de saúde ( $n=8$ ), e a capacidade de autogestão de medicamentos em casa ( $n=6$ ).

Quanto à literacia, foram utilizados critérios como a fluência numa língua específica ( $n=12$ ) e a capacidade de aceder ou utilizar um smartphone ( $n=13$ ), Internet ( $n=8$ ) ou mensagens de texto ( $n=7$ ). Apenas 18 estudos relataram o nível educacional dos participantes. Embora fossem utilizadas classificações diferentes, na maioria dos estudos os participantes tinham frequentemente pelo menos o ensino superior ou mais de 12 anos de escolaridade. Catorze estudos forneceram informações sobre a etnia, incluindo 12 nos EUA, um na América do Sul e um na Alemanha. Nestes estudos, os participantes brancos estavam geralmente sobre-representados, constituindo 31% a 95% dos indivíduos inscritos. O estado civil foi relatado em apenas seis estudos, sendo que os participantes casados constituíam aproximadamente metade dos indivíduos recrutados (variando de 59% a 66%), exceto num estudo que relatou uma frequência inferior (35%).

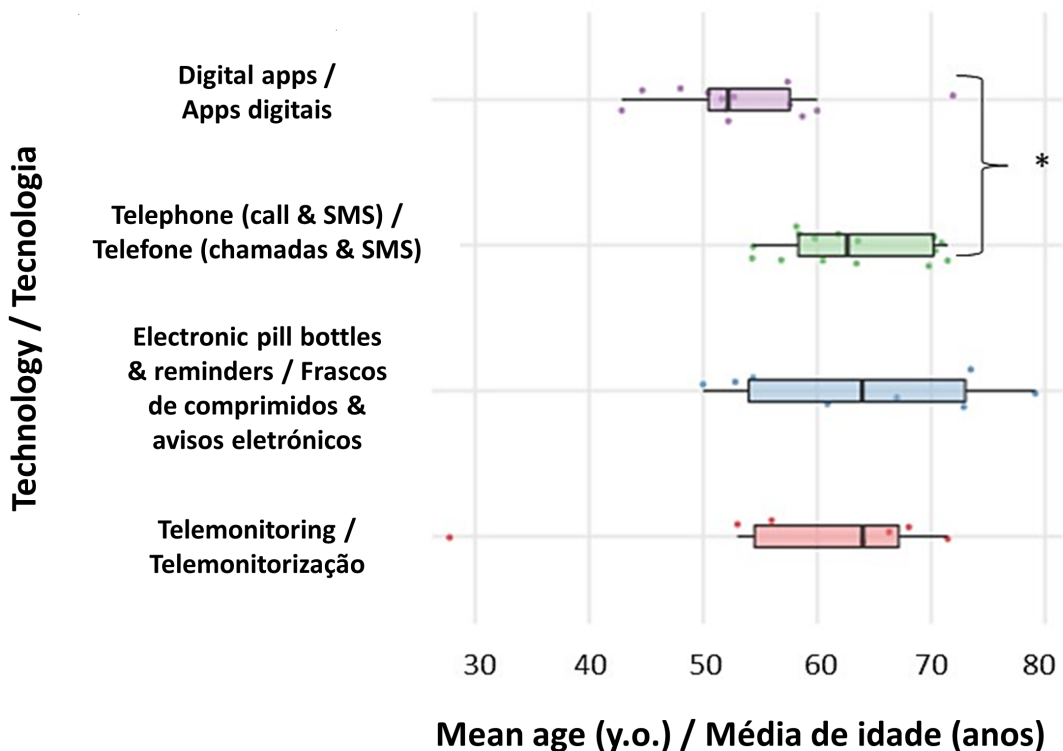
Os critérios de exclusão identificados foram principalmente relacionados com as dificuldades sentidas com as tecnologias, quer por deficiência cognitiva e mental (por exemplo: demência; depressão) ( $n=10$ ); incapacidade física ou outra deficiência biológica (por exemplo: deficiência visual) ( $n=6$ ); tratamentos médicos específicos ( $n=6$ ); viver numa instituição ( $n=6$ ); participação noutros estudos ( $n=3$ ) e baixa literacia (por exemplo: barreiras linguísticas e digitais; sem contacto disponível) ( $n=3$ ).

*e-Health interventions*

Regarding the types of e-Health interventions, a total of 21 studies employed telephone-based interventions to enhance medication adherence. These interventions consisted of stand-alone telephone calls (n=11), text messages (n=3), or a combination of telephone communication with pillboxes, reminders, interactive voice recognition, or tele-monitoring systems (n=7). Additionally, interventions utilizing stand-alone pill bottles/dispensers (n=5) and digital apps (n=8) were also common. Other interventions included the use of web-based tools (n=3), educational videos/books (n=2), video calls or webinars (n=2), and electronic reminders (n=1). It is worth noting that participants enrolled in studies using digital apps (including web-based tools, webinars, educational videos, or workbooks) or telemonitoring systems tended to be younger compared to those involved in studies utilizing "legacy" technologies such as the telephone (Figure 1). Notably, the majority of studies (91.0%) did not provide a characterization of participants' digital literacy.

*Intervenções de e-Health*

Relativamente aos tipos de intervenções de e-Health, um total de 21 estudos utilizou intervenções baseadas no telefone para melhorar a adesão à medicação. Estas intervenções consistiram em chamadas telefónicas (n=11), mensagens de texto (n=3) ou uma combinação de comunicação telefónica com caixas de comprimidos, lembretes, reconhecimento de voz interativo ou sistemas de telemonitorização (n=7). Além disso, as intervenções que utilizam frascos/dispensadores de comprimidos autónomos (n=5) e aplicações digitais (n=8) também foram comuns. Outras intervenções incluíram a utilização de ferramentas baseadas na Web (n=3), vídeos/livros educativos (n=2), videochamadas ou *webinars* (n=2) e lembretes electrónicos (n=1). É de salientar que os participantes inscritos em estudos que utilizaram aplicações digitais (incluindo ferramentas baseadas na Web, *webinars*, vídeos educativos ou livros de exercícios) ou sistemas de telemonitorização eram tendencialmente mais jovens em comparação com os participantes envolvidos em estudos que utilizaram tecnologias "antigas", como o telefone (Figura 1). De notar que a maioria dos estudos (91,0%) não forneceu uma caracterização da literacia digital dos participantes.



**Figure 1** - Participants' mean age according to the type of intervention (\* - ANOVA with the Tukey post hoc test; p-value=0.041).

**Figura 1** - Idade média dos participantes de acordo com o tipo de intervenção (\* - ANOVA com o teste post-hoc de Tukey; p=0,041)

## Discussion

To our knowledge, this is the first study attempting to explore the selection criteria in the assessment of e-Health interventions directly concerning medication adherence.

Older and less educated patients may have been underrepresented in some of the analyzed studies, particularly in those with digital apps. The higher average age of participants in studies utilizing "legacy" technologies like the telephone highlights the continued reliance on 19th-century technology in the digital era to support e-Health services. It is widely recognized that age and education are factors associated with e-Health utilization (64,65). However, if these technologies are intended to contribute to improving medication adherence, they must be accessible across diverse age groups and literacy levels. Our analysis reveals a consistent exclusion of older adults, individuals with low literacy, and those with mental health issues from the evaluation of these technologies. This serves as evidence that the digital divide, in terms of age, literacy, and mental health, continues to persist (15,66).

The issue of the digital divide becomes even more significant when considering medication adherence, as older adults often have more complex medication regimens, which can affect their ability to utilize e-Health solutions effectively (67). Consequently, a more customized approach is necessary (68). It is therefore crucial to assess how these solutions perform specifically in this population, a task that has yet to be comprehensively addressed. This challenge is closely tied to the development of technological solutions. Typically, developers design applications in controlled laboratory environments and then anticipate their successful implementation in real-world scenarios. However, evaluating the efficacy of these innovations requires selecting patients who possess the necessary skills to utilize them. Many times, this is not possible since the patients to whom these innovations were addressed do not have the necessary skills. Older patients are seldom involved in the development of technological or digital solutions due to their complexity, hindering their application in real life (69). To overcome this barrier, resorting to participatory design methodologies and implementation research frameworks may be possible solutions to better tailor future digital solutions in the context of healthcare (70,71).

## Discussão

Com base no que sabemos até o momento, este é o primeiro estudo que tenta explorar os critérios de seleção na avaliação de intervenções de e-Health sobre a adesão à medicação.

Os doentes mais velhos e menos instruídos podem ter estado sub-representados em alguns dos estudos analisados, particularmente naqueles com aplicações digitais. A idade média mais elevada dos participantes em estudos que utilizaram tecnologias "antigas", como o telefone, realça a dependência de uma tecnologia do século XIX na era digital para apoiar intervenções e-Health. É amplamente reconhecido que a idade e a educação são factores associados à utilização de e-Health (64,65). No entanto, se se pretende que estas tecnologias contribuam para melhorar a adesão à medicação, têm de ser acessíveis a diversos grupos etários e níveis de literacia. A nossa análise revela uma exclusão sistemática de adultos mais velhos, indivíduos com baixa literacia e pessoas com problemas de saúde mental da avaliação destas tecnologias. Isto é uma evidência de que a 'clivagem' digital, em termos de idade, literacia e saúde mental, continua a persistir (15,66).

A questão da 'clivagem' digital torna-se ainda mais significativa quando se considera a adesão à medicação, uma vez que os adultos mais velhos têm frequentemente regimes de medicação mais complexos, o que pode afetar a sua capacidade de utilizar eficazmente soluções de e-Health (67). Consequentemente, é necessária uma abordagem mais personalizada (68). É crucial avaliar o desempenho destas soluções especificamente nesta população, uma tarefa que ainda tem de ser abordada de forma generalizada. Este desafio está intimamente ligado ao desenvolvimento de soluções tecnológicas. Normalmente, os criadores concebem aplicações em ambientes laboratoriais controlados e depois antecipam a sua implementação bem-sucedida em cenários do mundo real. No entanto, a avaliação da eficácia destas inovações exige a seleção de doentes que possuam as competências necessárias para as utilizar. Muitas vezes isto não é possível, uma vez que os pacientes a quem estas inovações foram dirigidas não possuem as competências necessárias. Os pacientes mais velhos raramente estão envolvidos no desenvolvimento de soluções tecnológicas ou digitais, devido à sua complexidade, dificultando a sua aplicação na vida real (69). Para ultrapassar esta

None of the studies examined in our analysis employed a standardized approach to assessing participants' confidence in using the technology, either for screening purposes or to characterize them. In our analysis, we found that the few studies that included digital literacy as eligibility criteria used broad definitions, such as access/use of a technology, but did not attempt to characterize participants' capability of interacting with the proposed technology. Future research should use validated questionnaires to assess digital literacy, such as the e-Health Literacy Scale, the Media and Technology Usage and Attitudes Scale (72), among others. This could facilitate comparison among studies and better clarify how the inequities rising from the digital divide were approached. To effectively bridge this digital divide and minimize its impact on health equity, e-Health researchers must prioritize the integration of solutions aimed at enhancing digital literacy within their final interventions (73).

Ethnicity can be a determinant for eHealth access due to a combination of social, cultural, and structural factors, such as lower income levels, language barriers, or lack of diversity and cultural representation in the development of eHealth platforms, which can exacerbate disparities in health outcomes (74). In the studies analyzed, only those performed in the USA systematically collected data on the ethnicities of the participants. It is clear that most participants in all studies are white or of Caucasian ethnicity. None of the studies presented results on the effect of ethnicity on the results of the interventions. Moreover, up to 80% of the studies (35 out of 44) were performed in high-income countries (USA and Western European countries). This highlights the scarcity of research in low and middle-income countries, where the use of e-Health technologies, with the recognized potential to overcome the difficulties of dispersed geographic locations and rurality (66,75), may be more compromised (64,65). To some extent, this unmet need may delay the implementation of effective interventions for medication adherence.

barreira, a utilização de investigação participativa e metodologias de desenho centradas no utilizador pode ser uma solução para os promotores que visem conceber e implementar soluções digitais no contexto dos cuidados de saúde (70,71).

Nenhum dos estudos analisados avaliou a confiança na utilização da tecnologia de uma forma padronizada, nem para selecionar ou caracterizar os participantes. Na nossa análise, verificámos que os poucos estudos que incluíam a literacia digital como critério de elegibilidade, utilizavam definições amplas, tais como acesso/utilização de uma tecnologia, mas não tentavam caracterizar a capacidade de interação dos participantes com a tecnologia proposta. No futuro, sugere-se a utilização de questionários validados para avaliar a literacia digital, tais como a Escala de Literacia sobre e-Health, a Escala de Atitude para a Utilização dos Media e Tecnologias (72), entre outras. Isto poderia facilitar a comparação entre estudos e esclarecer melhor como foram abordadas as iniquidades devidas à 'clivagem digital'. Se os investigadores em e-Health quiserem resolver a existência desta 'clivagem digital' e minimizar o impacto que esta tem na equidade na saúde, é importante incorporar soluções para melhorar a literacia digital nas intervenções finais (73).

A etnia pode ser um fator determinante para o acesso à e-Health devido a uma combinação de factores sociais, culturais e estruturais, como níveis de rendimento mais baixos, barreiras linguísticas ou falta de diversidade e de representação cultural no desenvolvimento de plataformas e-Health, o que pode exacerbar as desigualdades nos resultados em saúde (74). Nos estudos analisados, apenas os realizados nos EUA recolheram sistematicamente dados sobre a etnia dos participantes. É evidente que a maioria dos participantes em todos os estudos são brancos ou de etnia caucasiana. Nenhum dos estudos apresentou resultados sobre o efeito da etnia nos resultados das intervenções. Além disso, até 80% dos estudos (35 dos 44) foram realizados em países de elevado rendimento (EUA e países da Europa Ocidental). Isto realça a escassez de investigação em países de baixo e médio rendimento, onde a utilização de tecnologias de e-Health, com o reconhecido potencial para ultrapassar as dificuldades de localizações geográficas dispersas e da ruralidade (66,75), pode estar mais comprometida (64,65). Esta necessidade não satisfeita pode, em certa medida, atrasar a implementação de intervenções eficazes sobre a adesão aos medicamentos.

Most evidence on the use of information technologies available is still sustained in observational studies or inadequately dimensioned experimental studies. This limitation significantly hampers the widespread implementation of e-Health applications within various health systems, as policymakers often require high-quality evidence to make informed decisions regarding the adoption of innovative solutions. Despite the mounting evidence highlighting the existence of the digital divide, it is evident that a concerted effort is necessary to expand our understanding of how interventions can be adapted to culturally diverse and economically disadvantaged settings. To achieve this, a shift towards an implementation research framework, as opposed to the traditional pure experimental approach, is called for. This approach will facilitate the exploration of contextual factors and enable the development of strategies that address the unique challenges posed by different populations and settings, thereby promoting more effective and equitable implementation of e-Health interventions (76). Another strategy that could provide more useful insights would be to perform realist reviews and synthesis of the literature, aiming to develop theories that can elucidate on when, why and how a certain program works (77).

Conducting a commentary based on individual studies extracted from only two recent systematic reviews on the topic may be seen as a significant limitation of the methodology we have used to sustain this work. Likewise, limiting our search to a single scientific journal (JMIR) can be seen as a limitation, but as previously mentioned, this is a leading journal in the field of digital medicine and it is not specific to any health condition, constituting an obvious choice for the authors. Nevertheless, we need to stress that our aim was to gather examples of the research produced on the topic and raise awareness about the inequities being introduced by the experimental assessment of e-Health interventions for medication adherence, in an attempt to contribute for improving future research efforts.

A maioria da evidência sobre o uso das tecnologias de informação disponíveis ainda se sustenta em estudos observacionais ou em estudos experimentais de dimensão inadequada. Isto tem impacto na implementação de aplicações de e-Health nos diferentes sistemas de saúde, uma vez que a maioria das decisões políticas necessita de evidência de nível elevado para decidir sobre a implementação de qualquer inovação. Apesar de todos os avisos da evidência de uma 'clivagem digital', é evidente que deve ser feito um esforço para construir conhecimento sobre a adaptação das intervenções a contextos culturais diversos e muitas vezes desfavorecidos do ponto de vista económico. Para tal, recomenda-se uma mudança para um quadro de investigação de implementação, por oposição à tradicional abordagem puramente experimental. Esta abordagem facilitará a exploração dos factores contextuais e permitirá o desenvolvimento de estratégias que respondam aos desafios únicos colocados pelas diferentes populações e contextos, promovendo assim uma implementação mais eficaz e equitativa das intervenções em e-Health (76). Uma outra estratégia que poderia fornecer conhecimentos mais úteis seria realizar revisões realistas e sínteses da literatura, visando desenvolver teorias que possam elucidar sobre quando, porquê e como funciona um determinado programa (77).

Realização de um comentário baseado em estudos individuais extraídos de apenas 2 revisões sistemáticas recentes sobre o tema pode ser visto como uma limitação importante da metodologia que utilizámos para sustentar este trabalho. De igual forma, limitar a nossa pesquisa a uma única revista científica (JMIR) pode ser considerada uma limitação mas como já foi salientado, esta é a revista líder no campo da medicina digital e não é específica de qualquer condição de saúde, constituindo uma escolha óbvia para os autores. No entanto, é necessário sublinhar que o nosso objectivo foi reunir exemplos da investigação produzida sobre o tema e sensibilizar para as iniquidades no acesso à e-Health introduzidas pela avaliação experimental das intervenções de e-Health para a adesão à medicação, numa tentativa de contribuir para melhorar futuros esforços de investigação.



## Conclusions

Inequities due to age, education, ethnicity, and digital literacy have been present in e-Health interventions. This digital divide still persists and little efforts have been made in recent years to tackle it. This hinders the assessment of the true impact of e-Health interventions concerning medication adherence in patients with multimorbidities and polymedication. It is, therefore, critical to foster equity in future research in this field, ensuring that technologies to improve adherence are evaluated inclusively by real-world patients, families, and caregivers.

## Authors' Contributions Statement

JG and CJ conceived, coordinated the study and wrote the first draft of the manuscript. JG, TM, PM, FR, JCS, MTH, and CJ extracted the information from the original reviews, and contributed to the writing of all subsequent drafts of the manuscript. IT, IA and TA have contributed to the last draft of the manuscript. JG edited the final version. All authors read and provided significant inputs into the drafts of the manuscript, agreed to be accountable for all aspects of the work and approved the final draft of the manuscript for publication.

## Funding

This research is based upon work from COST Action CA19132 "ENABLE," funded by COST (European Cooperation in Science and Technology). The funder had no role in the study design, data collection, analysis and interpretation, or preparation of the manuscript. João Gregório is funded by Foundation for Science and Technology (FCT) Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/EPH/2018.

## Conflict of Interests

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

## Conclusão

Iniquidades devido à idade, educação, etnia e literacia digital têm estado presentes nas intervenções de e-Health. Esta 'clivagem digital' ainda persiste e poucos esforços têm sido feitos nos últimos anos para a combater. Isto dificulta a avaliação do verdadeiro impacto das intervenções de e-Health para a adesão à medicação de pacientes com multimorbilidade e polimedicação. É, portanto, fundamental promover a equidade na investigação futura neste campo, assegurando que as tecnologias para melhorar a adesão sejam avaliadas de forma inclusiva com pacientes, seus familiares e cuidadores em contexto de mundo real.

## Declaração sobre as contribuições do autor

JG e CJ conceberam, coordenaram o estudo e escreveram o primeiro rascunho do manuscrito. JG, TM, PM, FR, JCS, MTH, e CJ extraíram a informação das revisões originais, e contribuíram para a redação de todos os rascunhos subsequentes do manuscrito. IT, IA e TA contribuíram para o último rascunho do manuscrito. JG editou a versão final. Todos os autores leram e deram contributos significativos para as diferentes versões do manuscrito, concordaram em ser responsáveis por todos os aspectos do trabalho e aprovaram a versão final do manuscrito para publicação.

## Financiamento

Esta investigação baseia-se no trabalho da ação COST CA19132 "ENABLE", financiada pela COST (Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia). O financiador não teve qualquer papel na conceção do estudo, recolha de dados, análise e interpretação, ou preparação do manuscrito. João Gregório é financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Contrato de Estímulo ao Emprego Científico com o número de referência CEEC/CBIOS/EPH/2018.

## Conflito de Interesses

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

## References / Referências









1. Nguyen, H., Manolova, G., Daskalopoulou, C., Vitoratou, S., Prince, M., & Prina, A. M. (2019). Prevalence of multimorbidity in community settings: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Comorbidity*, 9, 2235042X1987093. <https://doi.org/10.1177/2235042X19870934>
2. Sánchez-Fidalgo, S., Guzmán-Ramos, M. I., Galván-Banqueri, M., Bernabeu-Wittel, M., & Santos-Ramos, B. (2017). Prevalence of drug interactions in elderly patients with multimorbidity in primary care. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 39(2), 343–353. <https://doi.org/10.1007/s11096-017-0439-1>
3. World Health Organization. (2003). *Adherence to long-term therapies: Evidence for action / edited by Eduardo Sabaté*
4. Khan, R., & Socha-Dietrich, K. (2018). *Investing in medication adherence improves health outcomes and health system efficiency: Adherence to medicines for diabetes, hypertension, and hyperlipidaemia | OECD Health Working Papers | OECD iLibrary*. [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/investing-in-medication-adherence-improves-health-outcomes-and-health-system-efficiency\\_8178962c-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/investing-in-medication-adherence-improves-health-outcomes-and-health-system-efficiency_8178962c-en)
5. Viswanathan, M., Golin, C. E., Jones, C. D., Ashok, M., Blalock, S. J., Wines, R. C. M., Coker-Schwimmer, E. J. L., Rosen, D. L., Sista, P., & Lohr, K. N. (2012). Interventions to Improve Adherence to Self-administered Medications for Chronic Diseases in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 157(11), 785. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-11-201212040-00538>
6. van Boven, J. F. M., Lavorini, F., Dekhuijzen, P. N. R., Blasi, F., Price, D. B., & Viegi, G. (2017). Urging Europe to put non-adherence to inhaled respiratory medication higher on the policy agenda: A report from the First European Congress on Adherence to Therapy. *European Respiratory Journal*, 49(5), 1700076. <https://doi.org/10.1183/13993003.00076-2017>
7. Eysenbach, G. (2001). What is e-Health? *Journal of Medical Internet Research*, 3(2), e20. <https://doi.org/10.2196/jmir.3.2.e20>
8. Tabi, K., Randhawa, A. S., Choi, F., Mithani, Z., Albers, F., Schnieder, M., Nikoo, M., Vigo, D., Jang, K., Demlova, R., & Krausz, M. (2019). Mobile Apps for Medication Management: Review and Analysis. *JMIR mHealth and uHealth*, 7(9), e13608. <https://doi.org/10.2196/13608>
9. Brickwood, K.-J., Watson, G., O'Brien, J., & Williams, A. D. (2019). Consumer-Based Wearable Activity Trackers Increase Physical Activity Participation: Systematic Review and Meta-Analysis. *JMIR mHealth and uHealth*, 7(4), e11819. <https://doi.org/10.2196/11819>
10. Faiola, A., Papautsky, E. L., & Isola, M. (2019). Empowering the Aging with Mobile Health: A mHealth Framework for Supporting Sustainable Healthy Lifestyle Behavior. *Current Problems in Cardiology*, 44(8), 232–266. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2018.06.003>
11. Hamine, S., Gerth-Guyette, E., Faulx, D., Green, B. B., & Ginsburg, A. S. (2015). Impact of mHealth Chronic Disease Management on Treatment Adherence and Patient Outcomes: A Systematic Review. *Journal of Medical Internet Research*, 17(2), e52. <https://doi.org/10.2196/jmir.3951>
12. Stevenson, J. K., Campbell, S. C., Webster, A. C., Chow, C. K., Tong, A., Craig, J. C., Campbell, K. L., & Lee, V. W. (2019). E-Health interventions for people with chronic kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012379.pub2>
13. Pouls, B. P. H., Vrieseckolk, J. E., Bekker, C. L., Linn, A. J., van Onzenoort, H. A. W., Vervloet, M., van Dulmen, S., & van den Bemt, B. J. F. (2021). Effect of Interactive e-Health Interventions on Improving Medication Adherence in Adults With Long-Term Medication: Systematic Review. *Journal of Medical Internet Research*, 23(1), e18901. <https://doi.org/10.2196/18901>
14. Wong, Z. S., Siy, B., Da Silva Lopes, K., & Georgiou, A. (2020). Improving Patients' Medication Adherence and Outcomes in Nonhospital Settings Through e-Health: Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of Medical Internet Research*, 22(8), e17015. <https://doi.org/10.2196/17015>
15. Latulippe, K., Hamel, C., & Giroux, D. (2017). Social Health Inequalities and e-Health: A Literature Review With Qualitative Synthesis of Theoretical and Empirical Studies. *Journal of Medical Internet Research*, 19(4), e136. <https://doi.org/10.2196/jmir.6731>
16. Hansen, A. H., Bradway, M., Broz, J., Claudi, T., Henriksen, Ø., Wangberg, S. C., & Årsand, E. (2019). Inequalities in the Use of e-Health Between Socioeconomic Groups Among Patients With Type 1 and Type 2 Diabetes: Cross-Sectional Study. *Journal of Medical Internet Research*, 21(5), e13615. <https://doi.org/10.2196/13615>
17. Herndon, J. B., Chaney, M., & Carden, D. (2011). Health Literacy and Emergency Department Outcomes: A Systematic Review. *Annals of Emergency Medicine*, 57(4), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2010.08.035>
18. Bommakanti, K. K., Smith, L. L., Liu, L., Do, D., Cuevas-Mota, J., Collins, K., Munoz, F., Rodwell, T. C., & Garfein, R. S. (2020). Requiring smartphone ownership for mHealth interventions: Who could be left out? *BMC Public Health*, 20(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7892-9>
19. van Boven, J. F., Tsiglianni, I., Potočnjak, I., Mihajlović, J., Dima, A. L., Nabergoj Makovec, U., Ágh, T., Kardas, P., Ghiciuc, C. M., Petrova, G., Bitterman, N., Kamberi, F., Culig, J., & Wettermark, B. (2021). European Network to Advance Best Practices and Technology on Medication Adherence: Mission Statement. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.748702>
20. Côté, J., Fortin, M.-C., Auger, P., Rouleau, G., Dubois, S., Boudreau, N., Vaillant, I., & Gélinas-Lemay, É. (2018). Web-Based Tailored Intervention to Support Optimal Medication Adherence Among Kidney Transplant Recipients: Pilot Parallel-Group Randomized Controlled Trial. *JMIR Formative Research*, 2(2), e14. <https://doi.org/10.2196/formative.9707>
21. DeVito Dabbs, A., Song, M. K., Myers, B. A., Li, R., Hawkins, R. P., Pilewski, J. M., Bermudez, C. A., Aubrecht, J., Begey, A., Connolly, M., Alrawashdeh, M., & Dew, M. A. (2016). A Randomized Controlled Trial of a Mobile Health Intervention to Promote Self-Management After Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 16(7), 2172–2180. <https://doi.org/10.1111/ajt.13701>
22. Hosseinasab, M., Jahangard-Rafsanjani, Z., Mohagheghi, A., Sarayani, A., Rashidian, A., Javadi, M., Ahmadvand, A., Hadjibabaie, M., & Gholami, K. (2014). Self-Monitoring of Blood Pressure for Improving Adherence to Antihypertensive Medicines and Blood Pressure Control: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Hypertension*, 27(11), 1339–1345. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu062>
23. Hashimoto, S., Brinke, A. T., Roldaan, A. C., van Veen, I. H., Moller, G. M., Sont, J. K., Weersink, E. J. M., van der Zee, J. S., Braunstahl, G.-J., Zwinderman, A. H., Sterk, P. J., & Bel, E. H. (2011). Internet-based tapering of oral corticosteroids in severe asthma: A pragmatic randomised controlled trial. *Thorax*, 66(6), 514–520. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.153411>
24. Düsing, R., Handrock, R., Klebs, S., Tousset, E., & Vrijens, B. (2009). Impact of supportive measures on drug adherence in patients with essential hypertension treated with valsartan: The randomized, open-label, parallel group study VALIDATE. *Journal of Hypertension*, 27(4), 894–901. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328323f9be>
25. Henriksson, J., Tydén, G., Höijer, J., & Wadström, J. (2016). A Prospective Randomized Trial on the Effect of Using an Electronic Monitoring Drug Dispensing Device to Improve Adherence and Compliance. *Transplantation*, 100(1), 203–209. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000971>
26. Jeong, J. Y., Jeon, J.-H., Bae, K.-H., Choi, Y.-K., Park, K.-G., Kim, J.-G., Won, K. C., Cha, B. S., Ahn, C. W., Kim, D. W., Lee, C. H., & Lee, I.-K. (2018). Smart Care Based on Telemonitoring and Telemedicine for Type 2 Diabetes Care: Multi-Center Randomized Controlled Trial. *Telemedicine and e-Health*, 24(8), 604–613. <https://doi.org/10.1089/tmj.2017.0203>
27. Bobrow, K., Farmer, A. J., Springer, D., Shanyinde, M., Yu, L.-M., Brennan, T., Rayner, B., Namane, M., Steyn, K., Tarassenko, L., & Levitt, N. (2016). Mobile Phone Text Messages to Support Treatment Adherence in Adults With High Blood Pressure (SMS-Text Adherence Support [StAR]). *Circulation*, 133(6), 592–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017530>

28. Abughosh, S., Wang, X., Serna, O., Esse, T., Mann, A., Masilamani, S., Holstad, M. M., Essien, E. J., & Fleming, M. (2017). A Motivational Interviewing Intervention by Pharmacy Students to Improve Medication Adherence. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 23(5), 549–560. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2017.23.5.549>
29. Boyne, J. J., Vrijhoef, H. J. M., Spreeuwenberg, M., De Weerd, G., Kragten, J., & Gorgels, A. P. M. (2014). Effects of tailored telemonitoring on heart failure patients' knowledge, self-care, self-efficacy and adherence: A randomized controlled trial. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, 13(3), 243–252. <https://doi.org/10.1177/1474515113487464>
30. Choudhry, N. K., Isaac, T., Lauffenburger, J. C., Gopalakrishnan, C., Lee, M., Vachon, A., Iliadis, T. L., Hollands, W., Elman, S., Kraft, J. M., Naseem, S., Doheny, S., Lee, J., Barberio, J., Patel, L., Khan, N. F., Gagne, J. J., Jackevicius, C. A., Fischer, M. A., ... Sequist, T. D. (2018). Effect of a Remotely Delivered Tailored Multicomponent Approach to Enhance Medication Taking for Patients With Hyperlipidemia, Hypertension, and Diabetes. *JAMA Internal Medicine*, 178(9), 1182. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.3189>
31. Marek, K. D., Stetzer, F., Ryan, P. A., Bub, L. D., Adams, S. J., Schlidt, A., Lancaster, R., & O'Brien, A.-M. (2013). Nurse Care Coordination and Technology Effects on Health Status of Frail Older Adults via Enhanced Self-Management of Medication. *Nursing Research*, 62(4), 269–278. <https://doi.org/10.1097/NNR.0b013e318298aa55>
32. Claborn, K. R., Leffingwell, T. R., Miller, M. B., Meier, E., & Stephens, J. R. (2014). Pilot study examining the efficacy of an electronic intervention to promote HIV medication adherence. *AIDS Care*, 26(3), 404–409. <https://doi.org/10.1080/09540121.2013.824534>
33. Cizmic, A. D., Heilmann, R. M. F., Milchak, J. L., Riggs, C. S., & Billups, S. J. (2015). Impact of interactive voice response technology on primary adherence to bisphosphonate therapy: A randomized controlled trial. *Osteoporosis International*, 26(8), 2131–2136. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3116-z>
34. Márquez Contreras, E., Márquez Rivero, S., Rodríguez García, E., López-García-Ramos, L., Carlos Pastoriza Vilas, J., Baldonado Suárez, A., Gracia Díez, C., Gil Guillén, V., & Martell Claros, N. (2019). Specific hypertension smartphone application to improve medication adherence in hypertension: A cluster-randomized trial. *Current Medical Research and Opinion*, 35(1), 167–173. <https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1549026>
35. Mira, J. J., Navarro, I., Botella, F., Borrás, F., Nuño-Solinís, R., Orozco, D., Iglesias-Alonso, F., Pérez-Pérez, P., Lorenzo, S., & Toro, N. (2014). A Spanish Pillbox App for Elderly Patients Taking Multiple Medications: Randomized Controlled Trial. *Journal of Medical Internet Research*, 16(4), e99. <https://doi.org/10.2196/jmir.3269>
36. Montalescot, G., Brotons, C., Cosyns, B., Crijns, H. J., D'Angelo, A., Drouet, L., Eberli, F., Lane, D. A., Besse, B., Chan, A., Vicaut, E., & Darius, H. (2020). Educational Impact on Apixaban Adherence in Atrial Fibrillation (the AEGEAN STUDY): A Randomized Clinical Trial. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 20(1), 61–71. <https://doi.org/10.1007/s40256-019-00356-2>
37. Morawski, K., Ghazinouri, R., Krumme, A., Lauffenburger, J. C., Lu, Z., Durfee, E., Oley, L., Lee, J., Mohta, N., Haff, N., Juusola, J. L., & Choudhry, N. K. (2018). Association of a Smartphone Application With Medication Adherence and Blood Pressure Control. *JAMA Internal Medicine*, 178(6), 802. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.0447>
38. O'Connor, P. J., Schmittiel, J. A., Pathak, R. D., Harris, R. I., Newton, K. M., Ohnsorg, K. A., Heisler, M., Sterrett, A. T., Xu, S., Dyer, W. T., Raebel, M. A., Thomas, A., Schroeder, E. B., Desai, J. R., & Steiner, J. F. (2014). Randomized Trial of Telephone Outreach to Improve Medication Adherence and Metabolic Control in Adults With Diabetes. *Diabetes Care*, 37(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.2337/dc14-0596>
39. Reese, P. P., Bloom, R. D., Trofe-Clark, J., Mussell, A., Leidy, D., Levsky, S., Zhu, J., Yang, L., Wang, W., Troxel, A., Feldman, H. I., & Volpp, K. (2017). Automated Reminders and Physician Notification to Promote Immunosuppression Adherence Among Kidney Transplant Recipients: A Randomized Trial. *American Journal of Kidney Diseases*, 69(3), 400–409. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.10.017>
40. Rinfret, S., Lussier, M.-T., Peirce, A., Duhamel, F., Cossette, S., Lalonde, L., Tremblay, C., Guertin, M.-C., LeLorier, J., Turgeon, J., & Hamet, P. (2009). The Impact of a Multidisciplinary Information Technology-Supported Program on Blood Pressure Control in Primary Care. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 2(3), 170–177. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.108.823765>
41. Kamal, A. K., Khalid, W., Muqeet, A., Jamil, A., Farhat, K., Gillani, S. R. A., Zulfiqar, M., Saif, M., Muhammad, A. A., Zaidi, F., Mustafa, M., Gowani, A., Sharif, S., Bokhari, S. S., Tai, J., Rahman, N., Sultan, F. A. T., Sayani, S., & Virani, S. S. (2018). Making prescriptions “talk” to stroke and heart attack survivors to improve adherence: Results of a randomized clinical trial (The Talking Rx Study). *PLOS ONE*, 13(12), e0197671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197671>
42. Kessler, J. B., Troxel, A. B., Asch, D. A., Mehta, S. J., Marcus, N., Lim, R., Zhu, J., Shrank, W., Brennan, T., & Volpp, K. G. (2018). Partners and Alerts in Medication Adherence: A Randomized Clinical Trial. *Journal of General Internal Medicine*, 33(9), 1536–1542. <https://doi.org/10.1007/s11606-018-4389-7>
43. Kooij, M. J., Heerdink, E. R., van Dijk, L., van Geffen, E. C. G., Belitser, S. V., & Bouvy, M. L. (2016). Effects of Telephone Counseling Intervention by Pharmacists (TelCIP) on Medication Adherence; Results of a Cluster Randomized Trial. *Frontiers in Pharmacology*, 7(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00269>
44. Kooy, M. J., van Wijk, B. L. G., Heerdink, E. R., de Boer, A., & Bouvy, M. L. (2013). Does the use of an electronic reminder device with or without counseling improve adherence to lipid-lowering treatment? The results of a randomized controlled trial. *Frontiers in Pharmacology*, 4(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00069>
45. Levine, D., Torabi, J., Choinski, K., Rocca, J. P., & Graham, J. A. (2019). Transplant surgery enters a new era: Increasing immunosuppressive medication adherence through mobile apps and smart watches. *The American Journal of Surgery*, 218(1), 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2019.02.018>
46. Liu, W.-T., Huang, C.-D., Wang, C.-H., Lee, K.-Y., Lin, S.-M., & Kuo, H.-P. (2011). A mobile telephone-based interactive self-care system improves asthma control. *European Respiratory Journal*, 37(2), 310–317. <https://doi.org/10.1183/09031936.00000810>
47. Willems, D. C. M., Joore, M. A., Hendriks, J. J. E., Nieman, F. H. M., Severens, J. L., & Wouters, E. F. M. (2008). The effectiveness of nurse-led telemonitoring of asthma: Results of a randomized controlled trial. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, 14(4), 600–609. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2007.00936.x>
48. Young, L., Hertzog, M., & Barnason, S. (2016). Effects of a home-based activation intervention on self-management adherence and readmission in rural heart failure patients: The PATCH randomized controlled trial. *BMC Cardiovascular Disorders*, 16(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12872-016-0339-7>
49. Márquez Contreras, E., Márquez Rivero, S., Rodríguez García, E., López-García-Ramos, L., Carlos Pastoriza Vilas, J., Baldonado Suárez, A., Gracia Díez, C., Gil Guillén, V., & Martell Claros, N. (2019). Specific hypertension smartphone application to improve medication adherence in hypertension: A cluster-randomized trial. *Current Medical Research and Opinion*, 35(1), 167–173. <https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1549026>
50. Santschi, V., Rodondi, N., Bugnon, O., & Burnier, M. (2008). Impact of electronic monitoring of drug adherence on blood pressure control in primary care: A cluster 12-month randomised controlled study. *Em European Journal of Internal Medicine* (Vol. 19, Número 6, pp. 427–434). <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.12.007>
51. Svendsen, M. T., Andersen, F., Andersen, K. H., Pottegård, A., Johannessen, H., Möller, S., August, B., Feldman, S. R., & Andersen, K. E. (2018). A

- smartphone application supporting patients with psoriasis improves adherence to topical treatment: A randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*, 179(5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1111/bjd.16667>
52. Reese, P. P., Kessler, J. B., Doshi, J. A., Friedman, J., Mussell, A. S., Carney, C., Zhu, J., Wang, W., Troxel, A., Young, P., Lawnicki, V., Rajpathak, S., & Volpp, K. (2016). Two Randomized Controlled Pilot Trials of Social Forces to Improve Statin Adherence among Patients with Diabetes. *Journal of General Internal Medicine*, 31(4), 402–410. <https://doi.org/10.1007/s11606-015-3540-y>
53. Wakefield, B. J., Holman, J. E., Ray, A., Scherubel, M., Adams, M. R., Hills, S. L., & Rosenthal, G. E. (2012). Outcomes of a home tele-Health intervention for patients with diabetes and hypertension. *Telemedicine and e-Health*, 18(8), 575–579. <https://doi.org/10.1089/tmj.2011.0237>
54. Wald, D. S., Bestwick, J. P., Raiman, L., Brendell, R., & Wald, N. J. (2014). Randomised trial of text messaging on adherence to cardiovascular preventive treatment (INTERACT Trial). *PLoS ONE*, 9(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114268>
55. Abughosh, S. M., Wang, X., Serna, O., Henges, C., Masilamani, S., James Essien, E., Chung, N., & Fleming, M. (2016). A Pharmacist Telephone Intervention to Identify Adherence Barriers and Improve Adherence Among Nonadherent Patients with Comorbid Hypertension and Diabetes in a Medicare Advantage Plan. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 22(1), 63–73. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2016.22.1.63>
56. Vollmer, W. M., Owen-Smith, A. A., Tom, J. O., Laws, R., Ditmer, D. G., Smith, D. H., Waterbury, A. C., Schneider, J. L., Yonehara, C. H., Williams, A., Vupputuri, S., & Rand, C. S. (2014). Improving adherence to cardiovascular disease medications with information technology. *The American journal of managed care*, 20(11 Spec No. 17), SP502-10.
57. Sherrard, H., Struthers, C., Kearns, S. A., Wells, G., Chen, L., & Mesana, T. (2009). Using technology to create a medication safety net for cardiac surgery patients: A nurse-led randomized control trial. *Canadian journal of cardiovascular nursing = Journal canadien en soins infirmiers cardiovasculaires*, 19(3), 9–15.
58. Stacy, J. N., Schwartz, S. M., Ershoff, D., & Shreve, M. S. (2009). Incorporating Tailored Interactive Patient Solutions Using Interactive Voice Response Technology to Improve Statin Adherence: Results of a Randomized Clinical Trial in a Managed Care Setting. *Population Health Management*, 12(5), 241–254. <https://doi.org/10.1089/pop.2008.0046>
59. Jerant, A. F., Azari, R., Martinez, C., & Nesbitt, T. S. (2003). A Randomized Trial of Telenursing to Reduce Hospitalization for Heart Failure: Patient-Centered Outcomes and Nursing Indicators. *Home Health Care Services Quarterly*, 22(1), 1–20. [https://doi.org/10.1300/J027v22n01\\_01](https://doi.org/10.1300/J027v22n01_01)
60. Kamal, A. K., Shaikh, Q., Pasha, O., Azam, I., Islam, M., Memon, A. A., Rehman, H., Akram, M. A., Affan, M., Nazir, S., Aziz, S., Jan, M., Andani, A., Muqeet, A., Ahmed, B., & Khoja, S. (2015). A randomized controlled behavioral intervention trial to improve medication adherence in adult stroke patients with prescription tailored Short Messaging Service (SMS)-SMS4Stroke study. *BMC Neurology*, 15(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12883-015-0471-5>
61. Ducoulombier, V., Luraschi, H., Forzy, G., Vandecandelaere, M., & Houvenagel, E. (2015). Contribution of phone follow-up to improved adherence to oral osteoporosis treatment. *Am J Pharm Benefits*, 7(3), e81–e89.
62. Bosworth, H. B., Powers, B. J., Olsen, M. K., McCant, F., Grubber, J., Smith, V., Gentry, P. W., Rose, C., Houtven, C. Van, Wang, V., Goldstein, M. K., & Oddone, E. Z. (2011). Home Blood Pressure Management and Improved Blood Pressure Control. *Archives of Internal Medicine*, 171(13), 1173–1180. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.276>
63. Kim, J. Y., Wineinger, Nathan. E., & Steinhubl, Steven. R. (2016). The Influence of Wireless Self-Monitoring Program on the Relationship Between Patient Activation and Health Behaviors, Medication Adherence, and Blood Pressure Levels in Hypertensive Patients: A Substudy of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Medical Internet Research*, 18(6), e116. <https://doi.org/10.2196/jmir.5429>
64. Vicente, M. R., & Madden, G. (2017). Assessing e-Health skills across Europeans. *Health Policy and Technology*, 6(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2017.04.001>
65. Norman, C. D., & Skinner, H. A. (2006). EHEALS: The e-Health Literacy Scale. *Journal of Medical Internet Research*, 8(4), e27. <https://doi.org/10.2196/jmir.8.4.e27>
66. Butler, C., & Savalli, S. J. E. (2021). The Rising Implementation of Digital Health Platforms and Its Associated Inequities Among Patients with Mental Disorders: A Literature Review. *Undergraduate Research in Natural and Clinical Science and Technology (URNCT) Journal*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.26685/urnct.212>
67. Mangin, D., Parascandolo, J., Khudoyarova, O., Agarwal, G., Bismah, V., & Orr, S. (2019). Multimorbidity, e-Health and implications for equity: A cross-sectional survey of patient perspectives on e-Health. *BMJ Open*, 9(2), e023731. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023731>
68. Maffoni, M., Traversoni, S., Costa, E., Midão, L., Kardas, P., Kurczewska-Michalak, M., & Giardini, A. (2020). Medication adherence in the older adults with chronic multimorbidity: A systematic review of qualitative studies on patient's experience. *European Geriatric Medicine*, 11(3), 369–381. <https://doi.org/10.1007/s41999-020-00313-2>
69. Wilson, J., Heinsch, M., Betts, D., Booth, D., & Kay-Lambkin, F. (2021). Barriers and facilitators to the use of e-Health by older adults: A scoping review. *BMC Public Health*, 21(1), 1556. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11623-w>
70. Gregório, J., Reis, L., Peyroteo, M., Maia, M., Mira da Silva, M., & Lapão, L. V. (2021). The role of Design Science Research Methodology in developing pharmacy e-Health services. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(12), 2089–2096. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2021.05.016>
71. Scandurra, I., & Sjölander, M. (2013). Participatory Design With Seniors: Design of Future Services and Iterative Refinements of Interactive e-Health Services for Old Citizens. *Medicine 2.0*, 2(2), e12. <https://doi.org/10.2196/med20.2729>
72. Neves, A. L., Jácome, C., Taveira-Gomes, T., Pereira, A. M., Almeida, R., Amaral, R., Alves-Correia, M., Mendes, S., Chaves-Loureiro, C., Valério, M., Lopes, C., Carvalho, J., Mendes, A., Ribeiro, C., Prates, S., Ferreira, J. A., Teixeira, M. F., Branco, J., Santalha, M., ... Almeida Fonseca, J. (2021). Determinants of the Use of Health and Fitness Mobile Apps by Patients With Asthma: Secondary Analysis of Observational Studies. *Journal of Medical Internet Research*, 23(9), e25472. <https://doi.org/10.2196/25472>
73. Azzopardi-Muscat, N., & Sørensen, K. (2019). Towards an equitable digital public health era: Promoting equity through a health literacy perspective. *European Journal of Public Health*, 29(Supplement\_3), 13–17. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckz166>
74. Gordon, N. P., & Hornbrook, M. C. (2016). Differences in Access to and Preferences for Using Patient Portals and Other e-Health Technologies Based on Race, Ethnicity, and Age: A Database and Survey Study of Seniors in a Large Health Plan. *Journal of Medical Internet Research*, 18(3), e50. <https://doi.org/10.2196/jmir.5105>
75. Olu, O., Muneene, D., Bataringaya, J. E., Nahimana, M.-R., Ba, H., Turgeon, Y., Karamagi, H. C., & Dovlo, D. (2019). How Can Digital Health Technologies Contribute to Sustainable Attainment of Universal Health Coverage in Africa? A Perspective. *Frontiers in Public Health*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00341>
76. Damschroder, L. J., Aron, D. C., Keith, R. E., Kirsh, S. R., Alexander, J. A., & Lowery, J. C. (2009). Fostering implementation of health services research findings into practice: A consolidated framework for advancing implementation science. *Implementation Science*, 4(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1748-5908-4-50>
77. Luetsch, K., Maidment, I., Twigg, M., & Rowett, D. (2021). Realist research to inform pharmacy practice and policy. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(12), 2075–2081. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2021.06.026>

## Methods for cutaneous penetration assessment of organic UV filters - a review

### Métodos para avaliação da penetração cutânea de filtros solares orgânicos - uma revisão

Débora Quintas Balla <sup>1</sup> , Alicio Vitorino de Souza Neto <sup>1</sup> , Renata Miliani Martinez <sup>2</sup> , Alexandra de Almeida Hübner <sup>2</sup> , Catarina Rosado <sup>3</sup> , André Rolim Baby <sup>2</sup> , Fabiana Vieira Lima <sup>1</sup>  

**Keywords:** Franz cell, sunscreens, percutaneous penetration, tape stripping

**Palavras-chave:** Célula de Franz, filtros solares, penetração cutânea, *tape stripping*

#### To Cite:

Quintas Balla, D., Vitorino de Souza Neto, A., Miliani Martinez, R., de Almeida Hübner, A., Rosado, C., Rolim Baby, A., Vieira Lima, F. (2023) Methods for cutaneous penetration assessment of organic UV filters - a review. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 106-125.

 [10.19277/bbr.20.1.307](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.307)

1 - Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Health Science, Federal University of Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil

2 - Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

3 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[fabiana.v.lima@ufes.br](mailto:fabiana.v.lima@ufes.br)

Received / Recebido: 03/04/2023  
Accepted / Aceite: 31/05/2023

#### Abstract

Sunscreens are currently considered cosmetic assets and their use has considerably increased since consumers have become greatly aware of the damages induced by ultraviolet (UV) radiation on the skin, such as premature aging and cancer. However, concerns have arisen over the percutaneous absorption of UV filters. In order to ensure both efficacy and safety, sunscreens need to remain in the outermost layers of the stratum corneum, because their penetration into the dermis can cause systemic effects. Herein, a review was conducted of specialized literature published between 2000 to 2020, clustering studies focused on the skin penetration of UV filters. In this context, different *in vitro* and *in vivo* methodologies employed to assess the penetration of such compounds are highlighted, such as those based on tape stripping and diffusion cells. When combined with analytical methods, such as high-performance liquid chromatography, it is possible to trace a profile of the penetration of UV filters and elucidate factors that interfere with this phenomenon. Moreover, studies have been carried out on dissemination strategies that aim to encapsulate the molecules of UV filters, and/or change their physicochemical characteristics, in effort to increase the efficacy and safety of these formulations.

#### Resumo

Protetores solares são cosméticos amplamente usados atualmente, visto que a população tem se conscientizado cada vez mais dos danos que a radiação ultravioleta causa na pele, como envelhecimento precoce e câncer de pele. Porém os filtros solares podem ser tóxicos ao organismo quando penetram na pele. Para que sejam eficazes, os filtros solares precisam se depositar nas camadas mais externas do estrato córneo, pois sua penetração até a derme pode proporcionar efeitos sistêmicos. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de publicações no período dos anos 2000 a 2020, agrupando estudos de penetração de filtros solares. Neste contexto, destaca-se o uso de métodos *in vitro* e *in vivo* que avaliaram a penetração destes, como a técnica de *tape stripping* e o sistema de difusão de célula de Franz, que combinadas a métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria, permitiram traçar um perfil da penetração dessas substâncias e elucidar fatores que interferem na sua penetração. Ademais, estudos vêm sendo realizados com estratégias de veiculação que visam encapsular as moléculas de filtros solares, e/ou alterar suas características físico-químicas, visando aumento da eficácia e segurança do usuário.

## Introduction

The skin is the largest human organ in dimension and of relevance for the application of pharmacological and cosmetic substances. In this context, studies on the behavior of chemical actives when applied on the skin and on the mechanisms regulating their penetration through the *stratum corneum* (SC) are clearly important. SC acts on the skin as a diffusion barrier and, thus, several physicochemical characteristics of the components of the applied formulation should be considered for this analysis (1).

Sunscreens are among the most commonly used formulations for the skin, especially as exposure to ultraviolet radiation (UVR) is associated with various harmful effects such as skin cancer, erythema and premature skin aging (2). Sunscreens are defined by regulatory agencies as substances with the exclusive and/or main purpose of protecting the skin against UVR by absorbing, dispersing or reflecting radiation (3,4).

UV filters can be classified according to their mechanism of action as chemical (or organic) or as physical (or inorganic). To be effective, chemical filters need to accumulate in the SC layers, as they act by absorbing the UVR. The physical filters, in turn, must remain on the SC surface, forming a film reflecting the UVR (5).

When these molecules penetrate the *stratum corneum*, they can permeate through the remaining skin layers, leading to systemic circulation. The SC is the primary barrier to the penetration of substances, and can also act as a reservoir of these substances that are applied to the skin (6).

The penetration mechanism involves the entry of the sunscreen molecule into the most superficial layer of the skin but does not require the passage of it from one layer to another as occurs in the permeation movement (7). As it influences the partition from the formulation and its diffusion in the skin, the lipophilicity of the active molecules is one of the most significant mechanisms facilitating this permeation, and it is an important property to be studied to understand the penetration of sunscreens in the SC (8).

Penetration is the first step for filters to reach the vascularized layers of the skin, which can trigger toxic effects (9). Moreover, the permeation of the filters can lead to the loss of photoprotection, because, as mentioned above, the photoprotective action depends on the molecules remaining in the most superficial layers of the SC (10,11).

## Introdução

A pele é o maior órgão humano em extensão e de relevância para aplicação de substâncias farmacológicas e cosméticas. Neste contexto, enfatiza-se a importância de estudos do comportamento de ativos químicos quando aplicados sobre a pele e, seu mecanismo de penetração pelo estrato córneo (EC). O EC atua na pele, como uma barreira de difusão e por isso, uma série de características físico-químicas da formulação aplicada deve ser levada em conta para esta análise (1).

Os protetores solares estão entre as formulações mais comuns utilizadas sobre a pele, especialmente porque a exposição à radiação ultravioleta (RUV) está associada a vários efeitos nocivos como câncer de pele, eritema e envelhecimento precoce da pele (2). Os filtros solares são definidos pelos órgãos regulamentadores como substâncias com a finalidade exclusiva e/ou principal de proteger a pele contra RUV absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação (3,4).

Os filtros solares podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação em filtros químicos (ou orgânicos) e em filtros físicos (ou inorgânicos). Para serem eficazes os filtros químicos precisam se acumular no EC, pois agem absorvendo a RUV. Os filtros físicos por sua vez, devem permanecer na superfície da pele, formando um filme, refletindo a RUV (5).

Os filtros solares ao penetrarem no estrato córneo podem permear através da pele até a circulação sistêmica. O EC é a barreira primária para a penetração de substâncias, podendo atuar também como reservatório dessas substâncias que são aplicadas sobre a pele (6).

O mecanismo de penetração envolve a entrada da molécula do filtro solar na camada mais superficial da pele, mas não requer a passagem dela de uma camada para outra como ocorre no movimento de permeação (7). Uma vez que influencia a partição da formulação e a sua difusão na pele, a lipofilia das moléculas activas é um dos mecanismos mais significativos que facilitam esta permeação, e é uma propriedade importante a ser estudada para compreender a penetração dos protectores solares na SC (8).

A penetração é o primeiro passo para que os filtros alcancem as camadas vascularizadas da pele, o que pode desencadear efeitos tóxicos (9). Ademais, a permeação dos filtros pode acarretar na perda da fotoproteção, pelo fato de sua ação fotoprotetora depender das moléculas permanecerem nas camadas mais superficiais do EC (10,11).

In this framework, several methodologies for the evaluation of the penetration and permeation of substances in SC have been developed. Thus, the objective of this work was to conduct a review of the literature regarding the different *in vitro* and *in vivo* methodologies employed in the study of the penetration of chemical UV filters in the skin, as well as the factors that can influence the penetration profile of sunscreens in the skin.

## Material and Methods

The bases used for search were Google Scholar, Scielo, Pubmed, Scopus and CAPES Journals. The keywords used for the research were "sunscreen" and "penetration". The publication period selected for the research comprised publications from the years 2000 to 2020, finding a total of 20,277 results. Based on the results found, a selection was made by title, where 398 results were selected. The exclusion criteria of the titles used were the absence of the searched terms, the absence of methods that assess the penetration of filters, absence of chemical filters and, finally, review papers. The Mendeley Desktop platform was used to perform the selection, reading of abstracts and exclude duplicates. After reading the abstracts, 122 articles were selected. The same exclusion criteria were used after reading the articles, resulting in the selection of 61 articles for this review.

## Results and Discussion

The articles were analyzed in relation to the methodology used to evaluate the penetration and/or permeation of sunscreens on the skin, regarding the substrate used as a model for analysis and for the results presented.

To unify the UV filter nomenclature the international nomenclature of cosmetic ingredients (INCI) was used, other synonyms and details can be found in the [Supplementary Table](#). Among the most cited filters found in this review were butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl methoxycinnamate, and benzophenone-3 (Tables 1, 2 and 3, respectively). Table 4 details the list of UV filters found in isolation, whereas Table 5 contains filters in association, as well as the vehicles used, the methodology employed and the substrate that was used as a study model.

Diversos métodos para a avaliação da penetração e permeação de substâncias no EC tem sido aplicada, assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura a respeito dos diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* utilizados para o estudo de penetração de filtros solares químicos na pele, assim como, os fatores que podem influenciar no perfil de penetração dos mesmos na pele.

## Material e Métodos

As bases utilizadas para busca foram: Google Acadêmico, Scielo, Pubmed, Scopus e Periódicos CAPES. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram "sunscreen" e "penetration". O período de publicação selecionado para a pesquisa compreendeu publicações dos anos 2000 a 2020, encontrando no total 20.277 resultados. A partir dos resultados encontrados, realizou-se a seleção por título onde foram selecionados 398 resultados. Os critérios de exclusão dos títulos utilizados foram: a não presença dos termos buscados, a não utilização de métodos que avaliem a penetração dos filtros, ausência de filtros químicos e estudos de revisão. Foi utilizada a plataforma Mendeley Desktop para realização da seleção, leitura dos resumos e exclusão das duplicatas. Após a leitura dos resumos foram selecionados 122 artigos. Os mesmos critérios de exclusão foram utilizados após a leitura dos artigos, resultando na seleção de 61 artigos para esta revisão.

## Resultados e Discussão

Os artigos foram analisados em relação à metodologia utilizada para avaliação da penetração e/ou permeação dos filtros solares na pele, quanto ao substrato utilizado como modelo para análise e quanto aos resultados apresentados.

Para unificar a nomenclatura dos filtros solares foi utilizada a nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI), outros sinônimos e detalhes podem ser encontrados na [Tabela Suplementar](#). Entre os filtros UV mais encontrados nessa revisão destacaram-se *butyl methoxydibenzoylmethane*, *ethylhexyl methoxycinnamate*, e *benzophenone-3* (Tabelas 1, 2 e 3 respectivamente). Na Tabela 4 detalha-se lista filtros solares encontrados isoladamente, e na Tabela 5, em associação, assim como os veículos utilizados, a metodologia empregada e o substrato que foi utilizado como modelo de estudo.

**Table 1** - List of articles for UV filter butyl methoxydibenzoylmethane.

**Tabela 1** - Lista de artigos para o filtro solar butyl methoxydibenzoylmethane.

Vehicle/vectorization / Veículo/vetorização	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Microcapsules/Cyclodextrins / Microcápsulas/Ciclodextrinas	Tape Stripping and HPLC / <i>Tape Stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(46)
Cyclodextrins / Ciclodextrinas	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Human skin / Pele humana	(60)
-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin / Pele de ratos	(61)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography / Legenda: CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

**Table 2** - List of articles for UV filter ethylhexyl methoxycinnamate.

**Tabela 2** - Lista de artigos para o filtro solar ethylhexyl methoxycinnamate.

Vehicle/vectorization / Veículo/vetorização	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Poly nanoparticles / Poly nanopartículas	Tape stripping, HPLC and Confocal laser microscopy / <i>Tape stripping</i> , CLAE e Microscopia de Varredura Confocal a Laser	Swine skin / Pele suína	(12)
Lipid nanoparticles / Nanopartículas lipídicas	Franz cell; tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(64)
Nanocapsules; nanoemulsion; emulsion / Nanocápsulas; nanoemulsão; emulsão	-	Human skin / Pele humana	(49)
Nanoemulsion / Nanoemulsão	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(39)
Nanocapsules / Nanocápsulas	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(19)
Nanocapsules; liposomes; cyclodextrins / Nanocápsulas; lipossomos; ciclodextrinas	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(10)
Liposomes / Lipossomos	Tape stripping and HPLC / <i>Tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(65)
Polymeric nanocapsules / Nanocápsulas poliméricas	Tape stripping and HPLC / <i>Tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(41)
Liquid Crystal systems / Sistema de Cristais Líquidos	Franz cell, tape stripping and UPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e UPLC	Swine skin / Pele suína	(40)
Microcapsules; Cyclodextrins / Microcápsulas; Ciclodextrinas	Tape stripping and HPLC / <i>Tape Stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(47)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography ; UPLC - ultra high performance liquid chromatography /  
 Legenda: CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência



**Table 3** - List of articles for UV filter benzophenone-3.**Tabela 3** – Lista de artigos para o filtro solar benzofenona-3.

Vehicle/vectorization / Veículo/vetorização	Substances added / Substâncias adicionadas	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Hydroxypropyl cyclodextrin complex / Complexo de beta-hidroxiopropil ciclodextrinas	-	Photoacoustic spectroscopy / Espectroscopia Fotoacústica	Rabbit skin / Pele de coelhos	(15)
O/W emulsion; Starch microsponge / Emulsão O/A ; Microesponjas de amido	-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin / Pele de ratos	(13)
-	-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin / Pele de ratos	(62)
O/W emulsion / Emulsão O/A	-	-	Human skin / Pele humana	(36)
O/W emulsion; Submicron emulsion / Emulsão O/A ; Emulsão submicro	Coconut oil; Propyleneglycol; capic caprylictriglyceride acids / Óleo de coco; propilenoglicol; triglicérides de ácido capri-caprílicos	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin; Swine skin / Pele humana; Pele suína	(6)
-	DEET	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(55)
-	DEET	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(54,56)
-	DEET	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(56)
-	DEET	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(8)
Mesoporous silica / Sílicas mesoporosas	-	Franz cell and FTIR / Célula de Franz e FTIR		(63)
Polymeric nanoparticles / Nanopartículas poliméricas	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(44)
Lipid microparticles / Micropartículas lipídicas	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Swine skin / Pele suína	(43)
Lipid microparticles / Micropartículas lipídicas	-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(42)
-	Retinoides	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(25)
Polymeric nanocapsules / Nanocápsulas poliméricas	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Swine skin / Pele suína	(45)
Lipid nanoparticles; O/W emulsion / Nanopartículas lipídicas; Emulsão O/A	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Cellulose acetate membrane / Membrana de acetato celulose	(14)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography; O/W - oil/water; W/O - water/oil; DEET - N, N-diethyl-m-toluamide /  
 Legenda: CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; O/A - óleo/água; A/O - água/óleo; DEET - N,N-Dietil-m-toluamida

**Table 4** - List of articles by UV filter used alone.**Tabela 4** - Lista de artigos por filtro solar encontrado isoladamente.

UV filter / Filtro solar	Vehicle / Veículo	Substances added / Substâncias adicionadas	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	-	-	Tape Stripping and Raman spectroscopy / <i>Tape stripping</i> e Microscopia de Raman	Human skin / Pele humana	(16)
Benzophenone-8	Pullulan polysaccharides / Polissacarídeo de Pullulan	-	Franz cell and UV/VIS / Célula de Franz e UV/VIS	Rat skin / Pele de ratos	(58)
4-Methylbenzylidene Camphor	-	Cyclodextrins / Ciclodextrinas	Tape Stripping and HPLC / <i>Tape Stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(2)
4-Methylbenzylidene Camphor	-	-	Tape Stripping and HPLC / <i>Tape Stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(22)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography / Legenda: CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

Part of the studies selected in this review were conducted on formulations that could increase the retention of filters in the SC, avoiding their permeation to the dermis and hypodermis by encapsulation with the use of nano and microparticles, for example, and will be highlighted below.

The tape stripping technique and the study of diffusion using Franz diffusion cells were the most common approaches found among the studies. Some authors chose to use both methodologies in the same study in order to evaluate penetration *in vivo* and *in vitro*. Nevertheless, other methodologies were found, such as those based on photoacoustic microscopic mapping using Raman and electron microscopy (12-17).

The substrate used as a model membrane also varied, such as rat skin (18), rabbit (15), pig (19), and human skin (20), when performing the *in vitro* study.

#### *Tape stripping*

The evaluation of the penetration of UV filters in the skin is relevant for determining the safety of those used in sunscreen formulations. Studies have been developed to improve techniques that make it possible to trace the penetration profile of these substances, among them, the tape stripping technique has been widely used, being one of the most common methods for evaluating the penetration of substances in the SC.

Partes dos estudos encontrados dedicava-se a encontrar formulações que pudessem auxiliar na retenção dos filtros no EC, evitando a permeação dos filtros até a derme e hipoderme por meio de encapsulação dos filtros, com o uso de nano e micropartículas por exemplo e serão destacados a seguir.

A técnica de *tape stripping* e a utilização de difusão por meio de células de Franz foram os achados mais comuns entre os estudos. Alguns autores optaram por utilizar os dois métodos no mesmo estudo, a fim de avaliar a penetração de filtros *in vivo* e *in vitro*. Outros métodos também foram utilizados pelos investigadores, como espectroscopia fotoacústica, mapeamento microscópico de Raman e microscopia eletrônica (12-17).

O substrato utilizado como modelo de estudo também apresentou variações, como o de pele de ratos (18), coelhos (15), porcos (19) e pele humana (20), quando realizado o estudo *in vitro*.

#### *Tape stripping*

A avaliação da penetração dos filtros UV na pele é relevante para determinar a segurança dos utilizados em formulações de protetores solares. Estudos foram desenvolvidos para aprimoramento de técnicas que tornassem possível traçar o perfil de penetração dessas substâncias, entre elas, a técnica de *tape stripping* tem sido muito empregada, sendo um dos métodos mais comuns para avaliação da penetração de substâncias no EC.

**Table 5** - List of articles for UV filters in association (*continued next page*).**Tabela 5** - Lista de artigos para filtros solares em associação (*continua na página seguinte*).

UV filter (INCI name)/ Filtro UV (Designação INCI)	Vehicle/ vectorization / Veículo/vetorização	Substances Added / Substâncias adicionadas	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Benzophenone-3; Butyl methoxydibenzoylmethane; Ethylhexyl Methoxycinnamate; Ethylhexyl Salicylate; Homosalate; Octocrylene	-	-	Diffusion system / Sistema de Difusão	-	(52)
Benzophenone-3; Ethylhexyl methoxycinnamate; Homosalate	Gel-cream; petroleum jelly / Creme gel; Vaselina	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(38)
Benzophenone-3; Benzophenone-4	-	-	-	Human skin / Pele humana	(28)
Butyl methoxydibenzoylmethane; Octocrylene	Silica microparticles / Micropartículas de sílica	-	Tape stripping and FTIR / <i>Tape stripping</i> e FTIR	Swine skin / Pele suína	(66)
Benzophenone-3; Butyl methoxydibenzoylmethane; Ethylhexyl methoxycinnamate	Mesoporous silica / Sílica mesoporosas	-	Franz cell and UPLC MS/MS / Célula de Franz e UPLC MS/MS	Swine skin / Pele suína	(67)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate; Ethylhexyl methoxycinnamate; Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	O/W emulsion / Emulsão O/A	-	-	Human skin / Pele humana	(31)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate; Ethylhexyl methoxycinnamate; Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	-	Betacarotene and transresveratrol / Betacaroteno e transresveratrol	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Swine skin / Pele suína	(57)
Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol; Octocrylene	-	-	Franz cell; HPLC; UV/VIS spectroscopy / Célula de Franz; CLAE e Espectroscopia UV/VIS	Swine skin / Pele suína	(29)
Benzophenone-3; Ethylhexyl methoxycinnamate	-	Transcutol CG®-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin / Pele de ratos	(51)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	O/W emulsion / Emulsão O/A	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Swine skin / Pele suína	(30)
Benzophenone-3; Butyl methoxydibenzoylmethane; Octocrylene; Ethylhexyl dimethyl PABA	O/W emulsion / Emulsão O/A	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(68)
Benzophenone-3; Butyl methoxydibenzoylmethane;		-	Franz cell and Fluorescence microscopy / Célula de Franz e Microscopia de Fluorescência	Rat skin / Pele de ratos	(69)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography ; UPLC - ultra high performance liquid chromatography /  
 Legenda: CLAE - cromatografia líquida de altaeficiência; UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência

Table 5 - Continued / Tabela 5 - Continuação

UV filter (INCI name)/ Filtro UV (Designação INCI)	Vehicle/vectorization / Veículo/vetorização	Substances added / Substâncias adicionadas	Methodology / Metodologia	Substrate / Substrato	Reference / Referência
Ethylhexyl methoxycinnamate; Ethylhexyl Salicylate; Ethylhexyl dimethyl PABA	-	-	Fluorescence emission / Emissão por Fluorescência	HaCats cell culture / Cultura de células HaCats	(70)
Benzophenone-3; Butyl methoxydibenzoylmethane	Mesoporous silica / Sílicas mesoporosas	-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin; Swine skin / Pele de ratos; Pele suína	(34)
Benzophenone-3; Benzophenone-5; Ethylhexyl methoxycinnamate; Homosalate; Ethylhexyl dimethyl PABA	-	2,4 diclorophenoxyacetic acid	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Rat skin; Human skin / Pele de ratos; Pele humana	(53)
Benzophenone-3; Benzophenone-5; Ethylhexyl methoxycinnamate; Homosalate; Ethylhexyl dimethyl PABA	O/W emulsion; Emulsão O/A	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Human skin / Pele humana	(24)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; Butyl methoxydibenzoylmethane; Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate; Ethylhexyl methoxycinnamate; Ethylhexyl triazone	Lipid nanostructures; Nanoemulsion / Nanoestruturas lipídicas; Nanoemulsão	Betacarotene and transresveratrol / Betacaroteno e transresveratrol	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Human skin / Pele humana	(20)
Benzophenone-3; Ethylhexyl methoxycinnamate; Ethylhexyl Salicylate	Gel-cream; petroleum jelly / Creme gel; vaselina	-	Tape stripping; HPLC and Fickian diffusion / <i>Tape stripping</i> ; CLAE e Difusão de Fick	Human skin / Pele humana	(71)
Benzophenone-3; Ethylhexyl methoxycinnamate; Homosalate; Octocrylene	-	-	-	Human skin / Pele humana	(72)
Butyl methoxydibenzoylmethane; Ethylhexyl methoxycinnamate; Ethylhexyl triazone	Lipid microparticles; O/W Emulsion / Micropartículas lipídicas; Emulsão O/A	-	Tape Stripping e HPLC / <i>Tape Stripping</i> and CLAE	Human skin / Pele humana	(23)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate; Ethylhexyl triazone; Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	O/W Emulsion / Emulsão O/A	-	Franz cell, tape stripping and HPLC / Célula de Franz, <i>tape stripping</i> e CLAE	Swine skin / Pele suína	(11)
Ethylhexyl salicylate; Octocrylene	-	-	Raman Spectroscopy / Espectroscopia Confocal de Raman	Human skin / Pele humana	(73)
Butyl methoxydibenzoylmethane; Ethylhexyl methoxycinnamate	AL-PDA nanoparticles / Nanopartículas de AL-PDA	-	Franz cell and HPLC / Célula de Franz e CLAE	Swine skin / Pele suína	(50)

Legend: HPLC - high-performance liquid chromatography ; UPLC - ultra high performance liquid chromatography /  
Legenda: CLAE - cromatografia líquida de altaeficiência; UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência

This methodology is performed by applying and removing adhesive tapes successively in an area of the skin, which needs to be clean and free of hair. If these tapes are applied successively in the same skin site, they can contain an entire layer of SC, with the first tape containing the most superficial layer of cells and the other tapes corresponding to deeper layers (21).

The aggregates of corneocytes along with the substances that have been topically applied are transferred to the tapes, after which they are analyzed by quantitative spectrophotometric methods. One of the most commonly employed methods is UV/VIS spectrophotometry (22). Figure 1 shows the step by step application of the method on a volunteer's forearm.

One benefit of the tape stripping technique is that it is non-invasive and can be employed *in vivo* studies (6,16), which makes the study more realistic simulating the conditions of use of the formulation (23).

This methodology can also be applied *in vitro*, when used in conjunction with Franz cell, in which the SC of the biological model being studied is removed with adhesive tapes, making it possible to trace the penetration profile in the SC and the permeation profile of the substances at the same time. The membrane models used in these cases can be human skin discarded after plastic surgeries or animal models such as pig skin (24,25).

Some studies which used this methodology to evaluate the penetration of filters have shown that most of the filters applied to the skin could be recovered in the first tapes. This means that they penetrated only the most superficial layers of the SC, without evidence that deep penetration can be considered to the point of finding systemic circulation. It was also found that this penetration depends on the level of lipophilicity of the molecule, presenting greater affinity for SC, as is the case of benzophenone-3 (24,26).

Another benefit of using tape stripping is that it can evaluate penetration in a short period of time and with a small amount of filter applied to the skin (27). However, Couteau et al. (2001) demonstrated that when evaluating penetration over a longer period of time, the recovery content of the filters decreases, leading to the conclusion that the longer the filters remain on the skin, the greater their penetration (28).

Essa metodologia é realizada por meio da aplicação e remoção de fitas adesivas sucessivamente em uma área da pele, que precisa estar limpa e livre de pelos. Essas fitas que são aplicadas no mesmo local de pele, quando retiradas sucessivamente podem conter uma camada inteira de EC, sendo a primeira fita com a camada mais superficial de células e as demais fitas com camadas mais profundas (21).

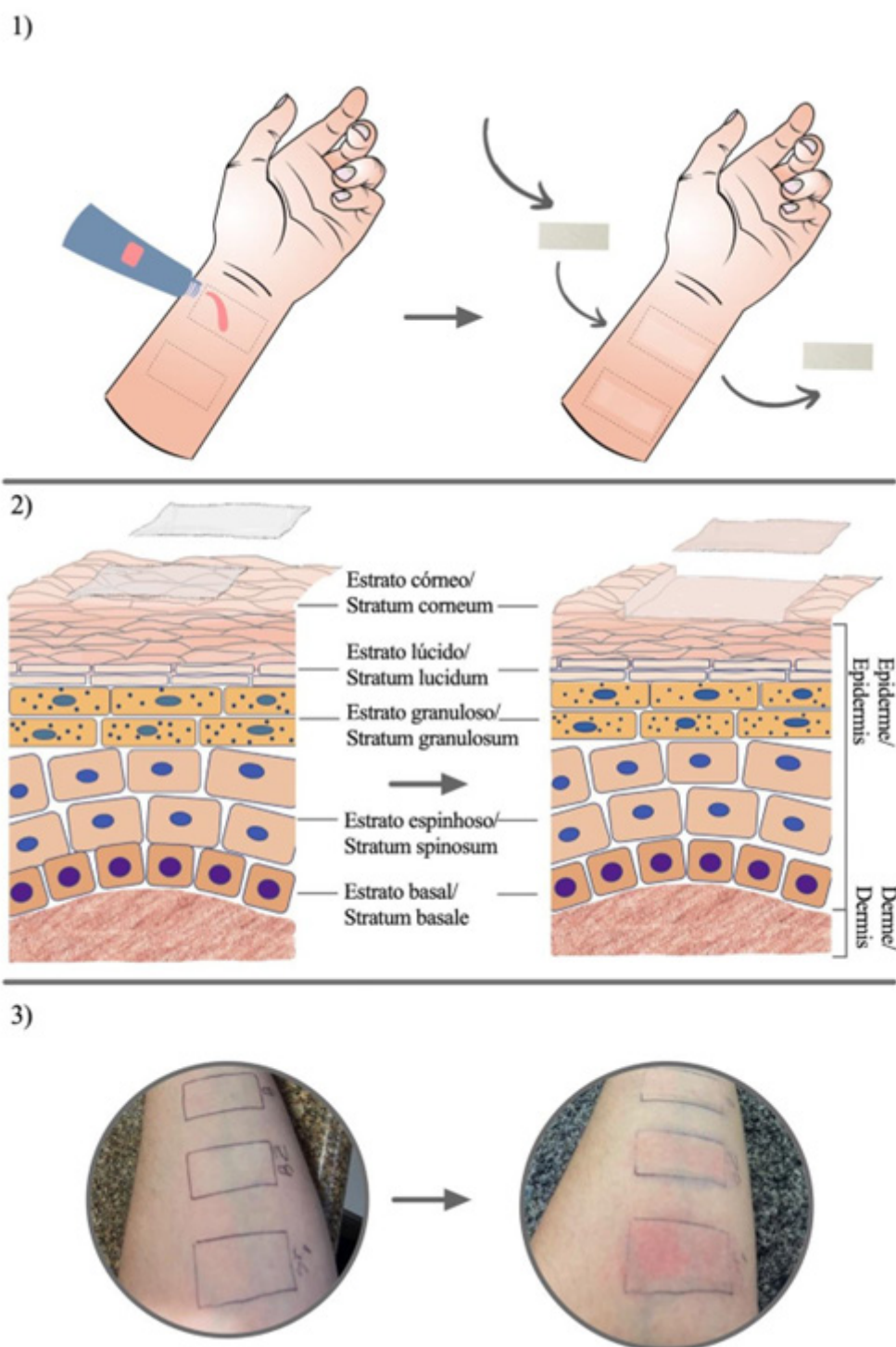
Os agregados de corneócitos junto com as substâncias que foram aplicadas topicamente são transferidos para as fitas, depois são analisadas por métodos espectrométricos para quantificar as mesmas na camada de estrato córneo retirada com as fitas. Um dos métodos utilizados é a espectrofotometria UV/VIS que permite determinar a quantidade de substâncias no EC removido em cada uma das fitas, podendo assim determinar se o EC foi retirado de forma homogênea (22). A Figura 1 mostra o passo a passo da aplicação do método no braço de um voluntário.

Uma benefício da técnica de *tape stripping* é que ela pode ser empregada para estudos *in vivo*, utilizando voluntários para a aplicação das substâncias (6,16); o que torna o estudo mais realista simulando as condições de uso da formulação (23).

Essa metodologia também pode ser aplicada *in vitro*, quando utilizada em conjunto com a célula de Franz, no qual o EC do modelo biológico que está sendo estudado é retirado com fitas adesivas, tornando possível traçar o perfil de penetração no EC e o perfil de permeação das substâncias ao mesmo tempo, os modelos usados nesses casos podem ser pele humana, advinda de cirurgias plásticas ou outros modelos como a pele de porco (24,25).

Alguns estudos, que utilizaram essa metodologia para avaliar a penetração de filtros, demonstraram que a maior parte dos filtros aplicados na pele, pôde ser recuperada nas primeiras fitas, ou seja, penetrando apenas nas camadas mais superficiais do EC sem evidência de que possa se considerar uma penetração profunda a ponto de encontrar a circulação sistêmica, mas que essa penetração depende do quanto a molécula é lipofílica, apresentando maior afinidade pelo EC, como é o caso da benzofenona-3 (24,26).

Outro benefício de se utilizar *tape stripping* é que o método pode avaliar a penetração em um curto período de tempo e com uma pequena quantidade do filtro aplicada sobre a pele (27). No entanto, Couteau et al. (2001) demonstraram que ao avaliar a penetração em um período maior de tempo, o teor de recuperação dos filtros diminui, levando a concluir que quanto maior o tempo que os filtros permanecem sobre a pele, maior é a sua penetração (28).



**Figure 1** - Representation of the tape stripping method: 1) The area is demarcated and specific quantity of the product is applied, and after a set time the tapes are applied and removed successively from the same location; 2) Representation of skin layers and superficial layers of the stratum corneum removed by the tapes; 3) Photographs demonstrating the procedure before and after the removal of the tapes at the place of application.

**Figura 1** - Representação do método de tape stripping: 1) A área é demarcada e quantidade específica do produto é aplicado, e após tempo determinado as fitas são aplicadas e retiradas sucessivamente do mesmo local; 2) Representação das camadas da pele e camadas superficiais do estrato córneo retirado pelas fitas; 3) Fotografias demonstrando o procedimento antes e após a retirada das fitas no local de aplicação.

When making a comparison between the techniques used to evaluate the penetration of sunscreens on the skin, tape stripping for an *in vivo* study and Franz cell for an *in vitro* analysis, researchers realized that both techniques, when used together, could help in the creation of new formulations of sunscreens, since the *in vivo* study model provides information on the penetration of filters in SC and the *in vitro* study model can help in the screening of new molecules that can act as sunscreens and new vehicles for formulations (14).

The tape stripping technique can also be combined with other analytical methods such as Raman confocal microscopy, that allows visualization of the contents of the tapes obtaining a three-dimensional view of the distribution of filters in the SC (16). It was also used in conjunction with spectrometric methods, such as photoacoustic spectroscopy, which enables evaluating the depth of the penetration profile of the filters through the length of thermal diffusion (15). Gebauer et al. (2012) demonstrated that this technique tied to tape *stripping* is useful in the analysis of the homogeneity of the UV filter distribution in the SC (29). However, Haque et al. (2016) observed that some excipients used in the formulation may interfere with the adhesive strip (30).

Regarding the results found on the recovery of filters in studies that used the tape stripping technique, it is noted that most have a recovery content of about 90%, as demonstrated for methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol - 91.1%, ethylhexyl methoxycinnamate - 103.5%, for diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate - 101.1%; for bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine - 90.6% (16,31).

#### *Franz diffusion cells*

This procedure is very often employed in the study of the skin permeation of topically applied substances. A Franz diffusion cell consists of two compartments, a recipient and a donor. The filter to be studied is deposited in the donor compartment, while in the receiving compartment there is a medium into which the compound diffuses, with a magnetic stirrer maintaining its homogeneity (32).

The two compartments are separated by a model membrane. Diverse tissues can be used, such as human skin or relevant animal models such as pigs, rats or rabbits (31-33). The dermis side of the cutaneous model is positioned next to the receptor

Ao fazer uma comparação entre as técnicas empregadas para avaliar a penetração dos filtros solares na pele, *tape stripping* para um estudo *in vivo* e célula de Franz para uma análise *in vitro*, os investigadores perceberam que ambas as técnicas, quando utilizadas em conjunto poderiam auxiliar na criação de novas formulações de protetores solares, visto que o modelo de estudo *in vivo* traz informações sobre a penetração dos filtros nos EC e o modelo de estudo *in vitro* pode ajudar na triagem de novas moléculas que podem atuar como filtros solares e novos veículos para as formulações (14).

A técnica de *tape stripping* também pode ser empregada junto com outros métodos analíticos como a microscopia confocal de Raman que permite a visualização do conteúdo das fitas obtendo uma visão tridimensional da distribuição dos filtros no EC (16). Também foi utilizada em conjunto com métodos espectrométricos, como a espectroscopia fotoacústica, que permite avaliar a profundidade do perfil de penetração dos filtros através do comprimento de difusão térmica (15). Gebauer et al. (2012) demonstraram que essa técnica atrelada ao *tape stripping* é útil na análise da homogeneidade que o filtro UV está distribuído no EC (29). No entanto, Haque et al. (2016) observou que alguns excipientes utilizados na formulação podem interferir na adesão das fitas (30).

Em relação aos resultados encontrados, sobre a recuperação dos filtros em estudos que utilizaram a técnica de *tape stripping*, nota-se que a maioria dos filtros possui teor de recuperação em cerca de 90%, como demonstrado para o *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* - 91,1%, para o *ethylhexyl methoxycinnamate* - 103.5%, para o *diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate* - 101,1%; para o *bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* - 90,6% (16,31).

#### *Célula de Franz*

Esse procedimento permite avaliar a permeação de substâncias topicamente aplicadas no EC. Ela consiste em duas células, uma receptora e uma doadora. Na célula doadora é depositado o filtro a ser estudado e na célula receptora há uma solução onde o composto se difunde. As duas células são separadas por uma membrana, equipadas com uma barra magnética para manter a solução de difusão homogênea (32).

Como membrana, diversos tecidos podem ser utilizados como por exemplo pele humana, ou modelos advindos de animais como porcos, ratos ou coelhos (31-33). O lado da derme do modelo cutâneo é posicionado junto a célula receptora, e a lado de

compartment and the SC side faces the donor, as shown in Figure 2. With Franz diffusion cells, it is possible to predict whether there will be systemic permeation of the filters, but the model membrane used should be considered in order to avoid bias, since it has been found that pig skin has greater permeability than human skin (30).

Many of the studies found in this review used the Franz cell as a research source for substance permeation in the skin in combination with the tape stripping technique, using analytical methods to quantify the penetration and permeation of substances with an *in vivo* and *in vitro* research model (6).

#### Study model membranes

As observed in the previous section, it is possible to perform penetration and permeation studies with several model membranes. In this review, synthetic membranes as well as human, pig, rats and rabbits skin were found (Tables 1-5).

The use of human skin is the most indicated for the study of sunscreen penetration because that is where the product is intended. The studies can be performed *in vivo* when performed on volunteers, or

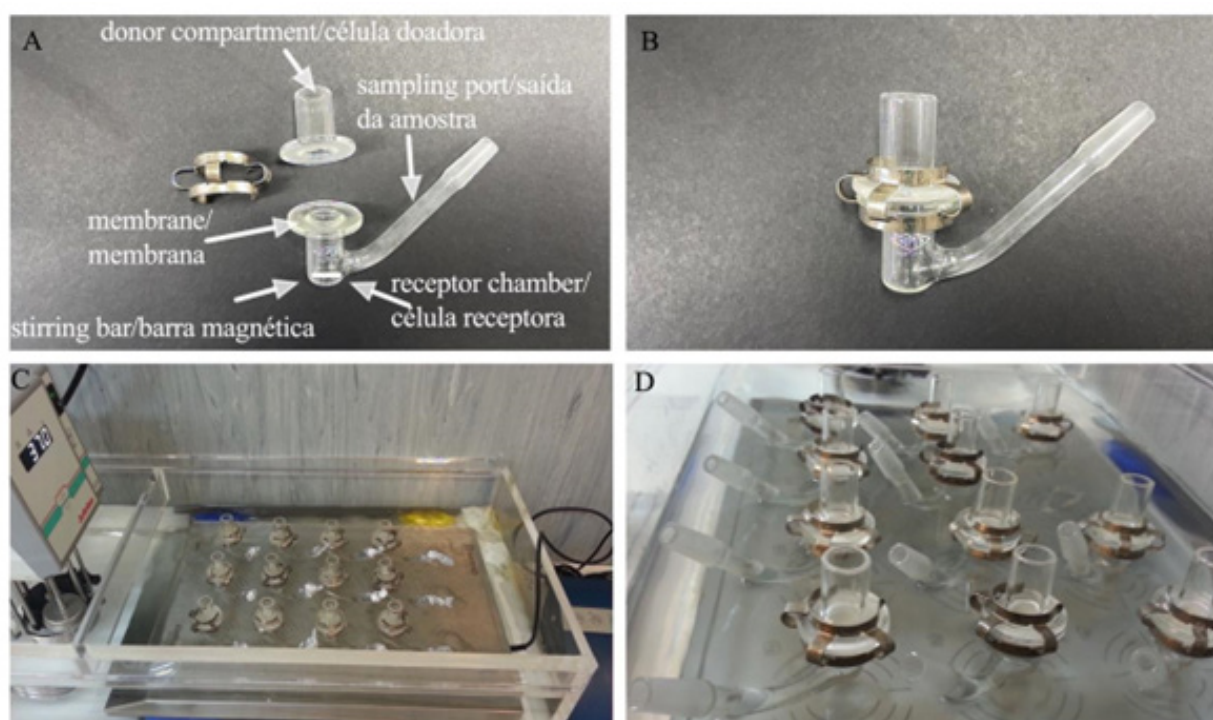
EC junto a célula doadora conforme Figura 2. Com a célula de Franz é possível avaliar se há permeação transdérmica dos filtros, mas o modelo utilizado deve ser observado, pois a pele suína que possui maior permeabilidade que a pele humana, e isto deve ser considerado nos estudos que utilizam essa técnica a fim de evitar vieses (30).

Muitos dos estudos encontrados nesta revisão utilizaram a célula de Franz como fonte de pesquisa para a permeação de substância na pele em combinação com a técnica de *tape stripping*, usando métodos analíticos para quantificar a penetração e permeação das substâncias com um modelo de pesquisa *in vivo* e *in vitro* (6).

#### Modelos de estudo

É possível realizar estudo de penetração e permeação com vários modelos de estudo, sendo os encontrados nessa revisão, membranas artificiais, pele humana, suína, ratos e de coelhos. Nesta revisão, diferentes tipos de pele como humanas, de porco, ratos e coelhos foram encontradas (Tabela 1-5).

A utilização de pele humana é a mais indicada para o estudo de penetração de filtros solares pois é a ela que o produto se destina. Os estudos podem ser realizados *in vivo* quando realizada em voluntários,



**Figure 2** - Representation of the Franz cell diffusion system: A) Parts of the cell; B) Cell arranged for use; C and D) Cells in a 37°C water bath.

**Figura 2** - Representação do sistema de difusão Célula de Franz: A) Partes da célula; B) Célula montada; C e D) Células em banho maria 37°C.



*in vitro* using skin removed from plastic surgeries, usually from the abdominal region or breast region (20).

When pig skin is used, many researchers prefer to use that removed from the ear, being considered an adequate study model since it is very similar to human skin (34). However, it has been found that when using the tape stripping method, it is possible to remove greater amounts of SC when this membrane is employed (30).

#### *Factors that determine the diffusion of sunscreens on the skin*

Among the factors that determine the diffusion of sunscreens in the skin are: physicochemical characteristics, vehicle used in the formulation, concentration of molecules and skin status (31). The first two of these factors will be highlighted below.

An important feature to be observed is the lipophilicity of the molecule. Lipophilic filters such as benzophenone-3, ethylhexyl methoxycinnamate, or 2-ethylhexyl salicylate are easier to penetrate the SC (27,35). The skin has both hydrophilic and lipophilic areas, and the partition coefficient (expressed as log P) can be used to predict the penetration of these molecules. If the partition coefficient is too low, the molecules are more water soluble and will have difficulties crossing the hydrophobic barrier of the stratum corneum (the lipophilic part of the skin). On the other hand, if lipophilicity increases too much, the molecules will remain in the SC and will have a low partition into the viable epidermis which is hydrophilic. The previous study showed the percutaneous penetration presented predicted behaviors according to log P, considering ideal log P 1 (31).

#### *Vehicle and vectorization*

There are several ways to modulate the penetration of sunscreens, such as changing the physical and chemical properties of the formulation, including increasing the viscosity of the formulation (26,36).

It is consensually considered that the vehicle used can influence percutaneous absorption, either increasing or blocking the passage of the UV filters (26). Therefore, the composition of the formulation should be carefully chosen to prevent the penetration of sunscreens into the skin (37).

A study by Chatelain et al. (2003) demonstrated that filter penetration is dependent on the vehicle used in the formulation. In that study, the filters

ou *in vitro* quando é feito o uso de pele retirada de cirurgias plásticas geralmente da região abdominal ou da região dos seios (20).

Quando é utilizada a pele suína, muitos pesquisadores preferem utilizar a pele retirada da orelha, sendo considerada um modelo de estudo por ser muito similar a pele humana (34). No entanto, quando comparada a pele humana, utilizando o método de *tape stripping*, é possível retirar uma maior quantidade EC na pele suína (30).

#### *Fatores que determinam a difusão dos filtros solares na pele*

Dentre os fatores que determinam a difusão dos filtros solares na pele estão: características físico-químicas, veículo utilizado na formulação, concentração das moléculas e o estado da pele (31). Serão destacados a seguir dois desses fatores: as características físico-químicas e o veículo das formulações.

Uma característica importante a ser observada é o quanto a molécula é lipofílica. Filtros lipofílicos como a *benzophenone-3*, *ethylhexyl methoxycinnamate*, *2-ethylhexyl salicylate* possuem mais facilidade de penetrar no EC (27,35). No entanto, a pele apresenta sítios hidrofílicos e lipofílicos, e o coeficiente de partição (log P n-octanol/água) pode ser usado para estudo da penetração dessas moléculas. Se o coeficiente de partição for muito baixo, as moléculas são mais hidrossolúveis e não passam a barreira do estrato córneo, por outro lado se for muito alto a lipofilicidade aumenta e as moléculas são tão solúveis que permanecem dissolvidas no EC. Estudo anterior mostrou que a penetração percutânea apresentou comportamentos preditivos de acordo com log P, considerado o log P 1 como ideal para penetração percutânea (31).

#### *Veículo e vetorização*

Há diversas formas de alterar a penetração dos filtros solares, como por exemplo alterar as propriedades físicas e químicas da formulação, entre elas, o aumento da viscosidade da formulação (26,36).

O veículo utilizado é muito importante na formulação, pois ele pode influenciar na absorção cutânea, aumentando ou bloqueando a passagem do filtro UV na pele (26). Portanto, deve ser cuidadosamente escolhido para evitar a penetração dos filtros solares na pele (37).

Foi demonstrado por Chatelain et al. (2003) que de fato, a penetração dos filtros é dependente do veículo usado na formulação pois nesse estudo os filtros

benzophenone-3, ethylhexyl methoxycinnamate, 2-ethylhexyl salicylate, homosalate and butyl methoxydibenzoylmethane had higher recovery rates when in formulations that had a gel cream as a vehicle rather than in petroleum jelly (38). In addition, the Sun Protection Factor (SPF) remained higher when the vehicle consisted of a gel cream, demonstrating that the filters remained in the most superficial layers of the SC. In another work, O/W emulsions have been shown to improve the penetration of benzophenone-4 (28).

Encapsulating the active molecules of the sunscreen has been shown to be a useful formulation strategy to increase the stability and efficacy of products containing UV filters (33). It has been shown that nanoemulsions can also assist in maintaining filters in the uppermost layers of SC (39).

Other studies have revealed that the use of liquid crystal systems may decrease the permeability of ethylhexyl methoxycinnamate in the skin (40). The use of nanocapsules can reduce the penetration of ethylhexyl methoxycinnamate forming a film on the surface and reducing penetration into the SC (19,33). On the other hand, the size of these nanoparticles should be taken into account, because particles larger than 10  $\mu\text{m}$  remain on the surface of the skin, whereas particles smaller than 3  $\mu\text{m}$  are distributed by the hair follicles and the SC (41).

The use of solid lipid microspheres caused a decrease in the penetration of ethylhexyl triazone and benzophenone-3, and was suggested by Mestres et al. (2010) as the ideal vehicle for formulations containing these filters (23,42). Martins et al. (2014) also suggested the formulation of these microspheres with natural waxes, such as bee wax and carnauba (43). On the other hand, the use of polymeric nanostructures and starch microsponges reduced the permeation of benzophenone-3 in the skin, even leading to an increase in the SPF (13,44).

Siqueira et al. (2011) observed that nanocapsules containing chitosan enabled maintaining benzophenone-3 in the most superficial layers of SC, and that vehicles containing these nanocapsules can prevent systemic distribution (45). Other studies have shown that the use of beta cyclodextrin microcapsules, as well as the use of lipid microparticles incorporated with ethylhexyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane filters, were able to reduce the penetration of butyl

*benzophenone-3, ethylhexyl methoxycinnamate, 2-ethylhexyl salicylate, homosalate e butyl methoxydibenzoylmethane* tiveram maiores taxas de recuperação quando em formulações que tinham como veículo um creme gel em vez de um veículo de vaselina (38). O Fator de Proteção Solar (FPS) se manteve mais elevado quando o veículo era constituído de um creme gel, demonstrando que os filtros mantiveram nas camadas mais superficiais do EC. No entanto, emulsões O/A demonstraram ser potencializadoras da penetração da benzofenona-4 (28).

Encapsular as moléculas do filtro solar tem se mostrado uma estratégia de formulação para aumentar a estabilidade e a eficácia de produtos contendo filtros solares (33). Foi demonstrado que nanoemulsões também podem auxiliar na manutenção dos filtros nas camadas mais superficiais do EC (39).

Outros estudos revelaram que a utilização de sistemas de cristais líquidos podem diminuir a permeabilidade do *ethylhexyl methoxycinnamate* na pele (40), assim como o uso nanocápsulas como veículo pode reduzir a penetração do *ethylhexyl methoxycinnamate*, formando um filme na superfície e diminuindo a penetração no EC (19,33). Por outro lado, o tamanho dessas nanopartículas deve ser levado em conta, pois partículas com tamanho maior que 10  $\mu\text{m}$  permanecem na superfície da pele e partículas menores que 3  $\mu\text{m}$  distribuem-se pelos folículos capilares e pelo EC (41).

O uso de microsferas lipídicas sólidas como veículo apresentou uma diminuição na penetração de *ethylhexyl triazone* e de *benzophenone-3*, sendo sugerido pelos autores Mestres et al. (2010) como o veículo ideal para formulações contendo esses filtros (23,42). Os autores Martins et al. (2014) sugerem também a formulação dessas microsferas com ceras naturais como as de abelha e de carnaúba (43). Por outro lado, a utilização de nanoestruturas poliméricas e microesponjas de amido se mostraram eficientes em reduzir a permeação da *benzophenone-3* na pele e até mesmo levar a um aumento do fator de proteção solar (13,44).

Siqueira et al. (2011) demonstraram também que nanocápsulas contendo quitosana apresentam eficiência em manter a *benzophenone-3* nas camadas mais superficiais do EC, e que fórmulas contendo essas nanocápsulas podem evitar a distribuição sistêmica da mesma (45). Outros estudos demonstram que a utilização de microcápsulas de beta ciclodextrina, bem como o uso de micropartículas lipídicas incorporadas aos filtros *ethylhexyl methoxycinnamate* e *butyl methoxydibenzoylmethane*, foram capazes de reduzir

methoxydibenzoylmethane through SC, an important effect to ensure protection to UV rays and also limit potential toxic reactions by these filters (46–48).

In a study conducted by Calderilla-Fajardo et al. (2006), when ethylhexyl methoxycinnamate was loaded in nanocapsules and nanoemulsions, in addition to altering the penetration and the retention of the filters in the SC, the SPF of the formulation was increased (49, 50).

A study conducted by Wissing & Müller (2002) showed that solid lipid nanoparticles enabled benzophenone-3 to remain longer on the skin surface, maintaining its sun protection function (14).

#### *Influence of other ingredients*

The use of adjuvants in formulations may or may not help the penetration of filters into the skin. Fernandez et al. (2000) showed that using coconut oil and triglycerides of capric and caprylic acid as solvents for UV filters limited skin permeation (6).

Another study showed that adding Transcutol® CG (diethylene glycol monoethyl ether) to transdermal bases facilitated the accumulation of benzophenone-3 and ethylhexyl methoxycinnamate filters in SC (51).

Some sunscreens can act as penetration enhancers of other substances. Studies show that in six out of nine tested products [ethylhexyl methoxycinnamate, 2-ethylhexyl salicylate, benzophenone-3, benzophenone-4, ethylhexyl dimethyl PABA and homosalate] increased the penetration of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), a herbicide used by farm workers (52,53).

Since there are formulations on the market that combine repellent and sun protection functions, some studies show that sunscreens can penetrate more into the skin when applied together with the use of biocides, such as benzophenone-3 which can penetrate about 89% more, when a repellent, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), is applied on it, presenting a synergistic effect (54–56). In other publications it was observed that the addition of antioxidants, such as trans-resveratrol and beta carotene, can also improve the performance of UV filters, increasing their SPF and decreasing their penetration into the SC (57).

a penetração da *butyl methoxydibenzoylmethane* através do EC, efeito importante para garantir a proteção aos raios UV e também limitar potenciais reações tóxicas por parte desses filtros (46–48).

Estudo conduzido por Calderilla-Fajardo et al. (2006) com o filtro solar *ethylhexyl methoxycinnamate* demonstrou que o uso de nanocápsulas e de nanoemulsões além de alterar a diminuir a penetração dos filtros aumentando a retenção dos filtros no estrato córneo, foi capaz de aumentar seu fator de proteção solar (49,50).

Estudo conduzido por Wissing & Müller (2002) mostrou que, nanopartículas lipídicas sólidas foram capazes de fazer com que a *benzophenone-3* permanecesse por mais tempo na superfície da pele, mantendo sua função de proteção solar (14).

#### *Influências de outras substâncias*

O uso de adjuvantes nas formulações pode auxiliar ou não na penetração dos filtros na pele. Fernandez et al. (2000) mostraram que o óleo de coco e de triglicéridos de ácido cáprico e caprílico como solventes para os filtros UV possuem o papel de limitar a permeação cutânea (6).

Outro estudo, demonstrou que, o Transcutol® CG (*diethylene glycol monoethyl ether*) adicionando à bases transdérmicas, facilitou o acúmulo dos filtros *benzophenone-3* e *ethylhexyl methoxycinnamate* no EC (51).

Alguns filtros solares podem atuar como potencializadores da penetração de outras substâncias. Estudos demonstram que seis de nove produtos testados [*ethylhexyl methoxycinnamate*, *2-ethylhexyl salicylate*, *benzophenone-3*, *benzophenone-4*, *ethylhexyl dimethyl PABA* e *homosalate*] podem aumentar a penetração do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) um herbicida usado por trabalhadores rurais (52,53).

Visto que há no mercado formulações que possuem função repelente e de proteção solar, alguns estudos demonstram que filtros solares podem penetrar mais na pele quando aplicados junto com o uso de repelentes, como a benzofenona-3 que pode penetrar cerca de 89% mais, quando um repelente, DEET (*N,N-diethyl-m-toluamide*), é aplicado sobre ela, apresentando um efeito sinérgico (54–56). No entanto, há publicações que demonstram que a adição de antioxidantes como o trans-resveratrol e o betacaroteno também podem mudar o perfil de penetração dos filtros, aumentando seu FPS e diminuindo sua penetração no EC (57).

Some sunscreens need to be stabilized in the formulation, such as 4-methylbenzilidene camphor, a filter that is currently in disuse. One of the forms of stabilization used is through cyclodextrin complexes, but Scalia et al. (2007) observed that these complexes do not influence the penetration profile of 4-methylbenzilidene camphor (2). Heo et al. (2018) added polysaccharides of pullulan into benzophenone-8 showing that this conjugated can increase the time that the filter is retained on the skin (58).

Finally, in a work observing the impact of caffeine in sunscreen formulations, an increase of approximately 25% in the anti-UVB protection was obtained, combined with good skin compatibility (59).

## Conclusion

Through the review of the articles in this study it is possible to conclude that the use of only one methodology can be considered for the evaluation of the penetration of sunscreens, but the combination of techniques such as Franz diffusion cells and tape stripping can reveal the complete profile of permeation and penetration of sunscreens in the skin.

The tape stripping technique reveals the penetration profile of filters associated with analytical methods such as high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. It is observed that the penetration of the filters into the SC does not necessarily imply that the filters had a transdermal passage. For this reason, the recovery content of the filters should be taken into account, and researchers should observe in which layers of the SC this content is higher, since a higher recovery content in the first tapes suggests the non-permeation of the UV filter.

To evaluate whether there is transdermal permeation, the method based in Franz diffusion cells is suitable, because it evaluates the passage of these substances through all the skin layers, both epidermis and dermis, being possible to evaluate whether the sunscreens could be available to reach blood circulation and act systemically.

Several factors can influence the penetration of sunscreens, such as the substrate used, the physicochemical characteristics, such as the partition coefficient and lipophilicity of the molecule, the vehicles used, interactions with other substances and the vectorization thereof.

Determinados filtros solares precisam ser estabilizados na formulação, como é o caso da *4-methylbenzilidene camphor*, um filtro que se encontra atualmente em desuso. Uma das formas de estabilização utilizada é por meio de complexos de ciclodextrinas, porém Scalia et al. (2007) (2) observaram que esses complexos não influenciam no perfil de penetração da *4-methylbenzilidene camphor*. Heo et al. (2018) adicionaram polissacarídeos de pullulan a *benzophenone-8*, um polissacarídeo natural, demonstrando que a formação desse conjugado pode aumentar o tempo que o filtro fica retido na pele (58).

Finalmente, um estudo observou a influência da cafeína em aumentar cerca de 25% a ação fotoprotetora UVB associada a boa compatibilidade cutânea (59).

## Conclusão

Através da revisão dos artigos nesse estudo é possível concluir que o uso de apenas uma metodologia pode ser considerada para a avaliação da penetração de filtros solares, porém a combinação de técnicas como a célula de Franz e *tape stripping* pode revelar o perfil completo de permeação e penetração dos filtros solares na pele.

A técnica de *tape stripping* revela o perfil de penetração dos filtros associado à métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência e métodos espectrométricos. Observa-se que a penetração dos filtros no EC não significa que os filtros tiveram uma passagem transdérmica, por essa razão deve se levar em conta o teor de recuperação dos filtros e observar em quais camadas do EC este teor foi maior, visto que um maior teor de recuperação nas primeiras fitas sugere a não permeação do filtro.

Para avaliar se há permeação transdérmica o método de difusão por célula de Franz, é o mais indicado, porque este avalia a passagem dessas substâncias em todas as camadas da pele, incluindo epiderme e derme, sendo possível avaliar se os filtros solares analisados poderiam estar disponíveis para alcançar a circulação sanguínea e atuar sistemicamente.

Vários fatores podem influenciar os resultados de penetração dos filtros solares, como o substrato utilizado, as características físico-químicas como o coeficiente de partição e a lipofilicidade da molécula, os veículos utilizados, a adição de outras substâncias e a vetorização destes.

It is noted that the use of these methodologies is important to ensure the safety and efficacy of these products, since filters such as benzophenone-3, ethylhexyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane, for example, present several reports that suggest penetration into the skin, and are still widely used in various formulations of sunscreens.

### Contributions of the Authors

Conceptualization, D.Q.B, A.V.S.N., F.V.L.; methodology, D.Q.B, F.V.L.; formal analysis, C.R., R.M.M., A.R.B.; research, D.Q.B, A.V.S.N., F.V.L.; writing, D.Q.B, R.M.M., A.A.H., C.R. original draft preparation, D.Q.B. ; writing and editing, D.Q.B., R.M.M., F.V.L. C.R.; supervision, F.V.L.; project administration, F.V.L.; acquisition of financing, D.Q.B.; F.V.L. All authors read and agreed with the published version of the manuscript.

### Funding

The authors thank the Foundation for Research and Innovation Support of Espírito Santo (FAPES) for the scientific initiation grant.

### Conflicts of Interest

The editors involved in this manuscript's 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.

Nota-se que o emprego desses métodos é importante para garantir a segurança e eficácia dos protetores solares, visto que filtros como a *benzophenone-3*, *ethylhexyl methoxycinnamate* e *butyl methoxydibenzoylmethane* por exemplo, apresentaram vários relatos que sugerem penetração na pele, e ainda são muito utilizados em diversas formulações de protetores solares.

### Contribuições autorais

Conceituação, D.Q.B, A.V.S.N., F.V.L.; metodologia, D.Q.B, F.V.L.; análise formal, C.R., R.M.M., A.R.B.; investigação, D.Q.B, A.V.S.N., F.V.L.; redação, D.Q.B, R.M.M., A.A.H.: preparação original do rascunho, D.Q.B.; redação e edição, D.Q.B., R.M.M., F.V.L.; supervisão, F.V.L.; administração de projetos, F.V.L.; aquisição de financiamento, D.Q.B.; F.V.L. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

### Financiamento

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa de iniciação científica.

### Conflitos de Interesse

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

## References / Referências

- Alves, N.C. (2015) Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *Amazônia Science & Health*, 3(4), 36–43. <https://doi.org/10.18606/2318-1419/amazonia.sci.health.v3n4p36-43>
- Scalia, S., Tursilli, R., & Iannuccelli, V. (2007) Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: Effect on photostability and human stratum corneum penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.016>
- BRASIL. (2012) Resolução. RDC nº 30, de 1º de junho de 2012. *Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores solares em Cosméticos e dá outras providências*, 1-7.
- EUROPEAN UNION. (2009) Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union L*, 342, 59-202.
- Flor, J., Davolos, M.R., & Correa, M.A. (2007) Protetores solares. *Química Nova*, 30(1), 153–158. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100027>
- Fernandez, C., Marti-Mestres, G., Ramos, J., & Maillols, H. (2000) LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of “in vitro” and “in vivo” skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00399-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00399-X)
- Bolzinger, M.A., Briançon, S., Pelletier, J., & Chevalier, Y. (2012) Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current opinion in colloid & interface science*, 17(3), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.02.001>
- Kasichayanula, S., House, J.D., Wang, T., & Gu, X. (2007) Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.016>
- Balaguer, A., Salvador, A., Chisvert, A., Meliá, M., Herráez, M., & Díez, O. (2006) A liquid chromatography-fluorimetric method for the in vitro estimation of the skin penetration of disodium phenyldibenzimidazole tetrasulfonate from sunscreen formulations through human skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7), 1225–1232. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0344-2>
- Monteiro, M.S.S.B., Ozzetti, R.A., Vergnanini, A.L., Brito-Gitirana, L., Volpato, N.M., Freitas, Z.M.F., Ricci-Júnior, E., & Santos, E.P. (2012) Evaluation of octyl p-methoxycinnamate included in liposomes and cyclodextrins in anti-solar preparations: preparations, characterizations and in vitro penetration studies. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3045–3058. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28550>
- Souza, C., & Maia Campos, P.M.B.G. (2017) Development of a HPLC method for determination of four UV filters in sunscreen and its application to skin penetration studies. *Biomedical Chromatography*, 31(12), e4029. <https://doi.org/10.1002/bmc.4029>
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y., Guy, R., & Fessi, H. (2004) Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 21(10), 1818–1825. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000045235.86197.ef>
- Bhuptani, R.S., & Patravale, V.B. (2019) Starch microsponges for enhanced retention and efficacy of topical sunscreen. *Materials Science and Engineering C*, 104, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109882>
- Wissing, S.A., & Müller, R.H. (2002) Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release*, 81(3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00056-1)
- Berbicz, F., Nogueira, A.C., Neto, A.M., Natali, M.R.M., Baesso, M.L., & Matioli, G. (2011) Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of benzophenone-3-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(2), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.026>
- Adlhart, C., & Baschong, W. (2011) Surface distribution and depths profiling of particulate organic UV absorbers by Raman imaging and tape stripping. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(6), 527–534. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00666.x>
- Bolzinger, M.A., Briançon, S., & Chevalier, Y. (2011) Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(5), 463–478. <https://doi.org/10.1002/wnan.146>
- Brand, R., McMahon, L., Jendrzewski, J., & Charron, A. (2007) Transdermal absorption of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid is enhanced by both ethanol consumption and sunscreen application. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.08.005>
- Jiménez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., & Martini, M.C. (2004) Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*, 272(1–2), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.029>
- Puglia, C., Damiani, E., Offerta, A., Rizza, L., Tirendi, G.G., Tarico, M.S., Curreri, S., Bonina, F., & Perrotta, R.E. (2014) Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, in vitro penetration and photostability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(1), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.09.023>
- Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.J., & Fluhr, J.W. (2009) The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.008>
- Weigmann, H.J., Jacobi, U., Antoniou, C., Tsirikas, G.N., Wendel, V., Rapp, C., Gers-Barlag, H., Sterry, W., & Lademann, J. (2005) Determination of penetration profiles of topically applied substances by means of tape stripping and optical spectroscopy: UV filter substance in sunscreens. *Journal of Biomedical Optics*, 10(1), 014009. <https://doi.org/10.1117/1.1854683>
- Scalia, S., Battaglioli, S., & Bianchi, A. (2019) In vivo Human Skin Penetration of the UV Filter Ethylhexyl Triazone: Effect of Lipid Microparticle Encapsulation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 32(1), 22–31. <https://doi.org/10.1159/000493761>
- Potard, G., Laugel, C., Schaefer, H., & Marty, J.P. (2000) The Stripping Technique: In vitro Absorption and Penetration of Five UV Filters on Excised Fresh Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 13(6), 336–344. <https://doi.org/10.1159/000029941>
- Padula, C., Campana, N., & Santi, P. (2008) Simultaneous determination of benzophenone-3, retinol and retinyl acetate in pig ear skin layers by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 22, 1060–1065. <https://doi.org/10.1002/bmc.1024>
- Fernandez, C., Marti-Mestres, G., Mestres, J.P., & Maillols, H. (2000) LC analysis of benzophenone-3 in pigskin and in saline solution: Application to determination of in vitro skin penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(2), 393–402. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00277-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00277-0)
- Fernandez, C., Nielloud, F., Fortuné, R., Vian, L., & Marti-Mestres, G. (2002) Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of in vivo human penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00630-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00630-6)
- Couteau, C., Perez Cullel, N., Connan, A.E., & Coiffard, L.J.M. (2001) Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human. *International Journal of Pharmaceutics*, 222(1), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00674-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00674-3)
- Gebauer, V., Weigmann, H.J., Schanzer, S., Meinke, M.C., Vergou, T., Sterry, W., & Lademann, J. (2012) Influence of skin aging effects on the

- skin surface profile and the correlated distribution of topically applied sunscreens. *Journal of Biophotonics*, 5(3), 274–282. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100104>chatelain
30. Haque, T., Crowther, J.M., Lane, M.E., & Moore, D.J. (2016) Chemical ultraviolet absorbers topically applied in a skin barrier mimetic formulation remain in the outer stratum corneum of porcine skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.041>
  31. Durand, L., Habran, N., Henschel, V., & Amighi, K. (2009) *In vitro* evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. *International Journal of Cosmetic Science*, 31(4), 279–292. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00498.x>
  32. Oliveira, C.A.M. (2009) *Estudos de permeação através da pele* (Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal). Available: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/4552/1/231152.pdf> [Accessed: 17-abr-2023]
  33. Vettor, M., Bourgeois, S., Fessi, H., Pelletier, J., Perugini, P., Pavanetto, F., & Bolzinger, M.A. (2010) Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 253–262. <https://doi.org/10.3109/10717540903097770>
  34. Lin, Y.C., Lin, C.F., Alalaiwe, A., Wang, P.W., Fang, Y.P., & Fang, J.Y. (2018) UV filter entrapment in mesoporous silica hydrogel for skin protection against UVA with minimization of percutaneous absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.013>
  35. Sarveiya, V., Templeton, J., & Benson, H. (2004) Inclusion Complexation of the Sunscreen 2-Hydroxy-4-Methoxy Benzophenone (Oxybenzone) with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin: Effect on Membrane Diffusion. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 49(3–4), 275–281. <https://doi.org/10.1007/s10847-004-6098-6>
  36. Cross, S.E., Jiang, R., Benson, H.A.E., & Roberts, M.S. (2001) Can Increasing the Viscosity of Formulations be used to Reduce the Human Skin Penetration of the Sunscreen Oxybenzone? *Journal of Investigative Dermatology*, 117(1), 147–150. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01398.x>
  37. Vilela, F.M.P., Fonseca, Y.M., Vicentini, F.T.M.C., Fonseca, M.J.V., & Do Amaral, M.D.P.H. (2011) Determination of three ultraviolet filters in sunscreen formulations and from skin penetration studies by high-performance liquid chromatography. *Química Nova*, 34(5), 879–883. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000500026>
  38. Chatelain, E., Gabard, B., & Surber, C. (2003) Skin Penetration and Sun Protection Factor of Five UV Filters: Effect of the Vehicle. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 16(1), 28–35. <https://doi.org/10.1159/000068291>
  39. Hanno, I., Anselmi, C., & Bouchemal, K. (2012) Polyamide Nanocapsules and Nano-emulsions Containing Parsol® MCX and Parsol® 1789: *In Vitro* Release, *Ex Vivo* Skin Penetration and Photo-Stability Studies. *Pharmaceutical Research*, 29(2), 559–573. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0592-5>
  40. Prado, A.H., Borges, M.C., Eloy, J.O., Peccinini, R.G., & Chorilli, M. (2017) An ultra-high performance liquid chromatography method to determine the skin penetration of an octyl methoxycinnamate-loaded liquid crystalline system. *Pharmazie*, 72(10), 563–567. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.7037>
  41. Olvera-Martínez, B., Cázares-Delgado, J., Calderilla-Fajardo, S., Villalobos-García, R., Ganem-Quintanar, A., & Quintanar-Guerrero, D. (2005) Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: Penetration across the stratum corneum. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(7), 1552–1559. <https://doi.org/10.1002/jps.20352>
  42. Mestres, J.P., Duracher, L., Baux, C., Vian, L., & Marti-Mestres, G. (2010) Benzophenone-3 entrapped in solid lipid microspheres: Formulation and *in vitro* skin evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.028>
  43. Martins, R., Siqueira, S., Fonseca, M., & Freitas, L. (2014) Skin penetration and photoprotection of topical formulations containing benzophenone-3 solid lipid microparticles prepared by the solvent-free spray-congealing technique. *Journal of Microencapsulation*, 31(7), 644–653. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.911378>
  44. Marcato, P., Caverzan, J., Rossi-Bergmann, B., Pinto, E., Machado, D., Silva, R., Justo, G., Ferreira, C., & Durán, N. (2011) Nanostructured Polymer and Lipid Carriers for Sunscreen. Biological Effects and Skin Permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(3), 1880–1886. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3135>
  45. Siqueira, N.M., Contri, R.V., Paese, K., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., & Guterres, S.S. (2011) Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000323273>
  46. Scalia, S., Mezzena, M., & Ramaccini, D. (2011) Encapsulation of the UV Filters Ethylhexyl Methoxycinnamate and Butyl Methoxydibenzoylmethane in Lipid Microparticles: Effect on *in vivo* Human Skin Permeation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(4), 182–189. <https://doi.org/10.1159/000324054>
  47. Scalia, S., Coppi, G., & Iannuccelli, V. (2011) Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane: *In vivo* skin penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.018>
  48. Scalia, S., & Mezzena, M. (2009) Incorporation in Lipid Microparticles of the UVA Filter, Butyl Methoxydibenzoylmethane Combined with the UVB Filter, Octocrylene: Effect on Photostability. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10(2), 384–390. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9217-2>
  49. Calderilla-Fajardo, S.B., Cázares-Delgado, J., Villalobos-García, R., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., & Robles, R. (2006) Influence of Sucrose Esters on the *In Vivo* Percutaneous Penetration of Octyl Methoxycinnamate Formulated in Nanocapsules, Nanoemulsion, and Emulsion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32(1), 107–113. <https://doi.org/10.1080/03639040500388540>
  50. Zhou, Y., Qian, Y., Wang, J., Qiu, X., & Zeng, H. (2020) Bioinspired Lignin-Polydopamine Nanocapsules with Strong Bioadhesion for Long-Acting and High-Performance Natural Sunscreens. *Biomacromolecules*, 21(8), 3231–3241. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00696>
  51. Godwin, D.A., Kim, N.H., & Felton, L.A. (2002) Influence of Transcutol® CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00215-6)
  52. Brand, R., Spalding, M., & Mueller, C. (2002) Sunscreens Can Increase Dermal Penetration of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 40(7), 827–832. <https://doi.org/10.1081/clt-120016952>
  53. Pont, A.R., Charron, A.R., & Brand, R.M. (2004) Active ingredients in sunscreens act as topical penetration enhancers for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.021>
  54. Gu, X., Wang, T., Collins, D.M., Kasichayanula, S., & Burczynski, F.J. (2005) *In vitro* evaluation of concurrent use of commercially available insect repellent and sunscreen preparations. *British Journal of Dermatology*, 152(6), 1263–1267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06691.x>

55. Gu, X., Kasichayanula, S., Fediuk, D.J., & Burczynski, F.J. (2004) In-vitro permeation of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) and the sunscreen oxybenzone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(5), 621–628. <https://doi.org/10.1211/0022357023402>
56. Kasichayanula, S., House, J.D., Wang, T., & Gu, X. (2005) Simultaneous analysis of insect repellent DEET, sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-phase HPLC with UV detection: Application to an in vivo study in a piglet model. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 822(1–2), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.015>
57. Freitas, J.V., Praça, F.S.G., Bentley, M.V.L.B., & Gaspar, L.R. (2015) *Trans-resveratrol* and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1–2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.062>
58. Heo, S., Hwang, H.S., Jeong, Y., & Na, K. (2018) Skin protection efficacy from UV irradiation and skin penetration property of polysaccharide-benzophenone conjugates as a sunscreen agent. *Carbohydrate Polymers*, 195, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.010>
59. Rosado, C., Tokunaga, V.K., Sauce, R., Oliveira, C.A., Sarruf, F.D., Parise-Filho, R., Maurício, E., Almeida, T.S., Velasco, M.V.R., & Baby, A.R. (2019) Another Reason for Using Caffeine in Dermocosmetics: Sunscreen Adjuvant. *Frontiers in Physiology*, 10(519), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00519>
60. Simeoni, S., Scalia, S., & Benson, H.A.E. (2004) Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1–2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.021>
61. Yang, J., Wiley, C.J., Godwin, D.A., & Felton, L.A. (2008) Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.015>
62. Chen, W.Y., Fang, C.L., Al-Suwayeh, S., Yang, H.H., Li, Y.C., & Fang, J.Y. (2013) Risk assessment of excess drug and sunscreen absorption via skin with ablative fractional laser resurfacing. *Lasers in Medical Science*, 28(5), 1363–1374. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1257-2>
63. Li, C.C., Lin, Y.T., Chen, Y.T., Sie, S.F., & Chen-Yang, Y.W. (2015) Improvement in UV protection retention capability and reduction in skin penetration of benzophenone-3 with mesoporous silica as drug carrier by encapsulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 148 [s.n.], 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.027>
64. Andréo-Filho, N., Bim, A.V.K., Kaneko, T.M., Kitice, N.A., Haridass, I.N., Abd, E., Lopes, P.S., Thakur, S.S., Parekh, H.S., Roberts, M.S., Grice, J.E., Benson, H.A.E., & Leite-Silva, V.R. (2018) Development and Evaluation of Lipid Nanoparticles Containing Natural Botanical Oil for Sun Protection: Characterization and in vitro and in vivo Human Skin Permeation and Toxicity. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000481691>
65. Mota, A.C.V., Freitas, Z.M.F., Ricci Jr., E., Dellamora-Ortiz, G.M., Santos-Oliveira, R., Ozzetti, R.A., Vergnanini, A.L., Ribeiro, V.L., Silva, R.S., & dos Santos, E.P. (2013) In vivo and in vitro evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes. *International Journal of Nanomedicine*, 8(1), 4689. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51383>
66. Cozzi, A.C., Perugini, P., & Gourion-Arsiquaud, S. (2018) Comparative behavior between sunscreens based on free or encapsulated UV filters in term of skin penetration, retention and photo-stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121, 309–318.
67. Daneluti, A.L.M., Neto, F.M., Ruscinc, N., Lopes, I., Velasco, M.V.R., Matos, J.R., Baby, A.R., & Kalia, Y.N. (2019) Using ordered mesoporous silica SBA-15 to limit cutaneous penetration and transdermal permeation of organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 570, 118633. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118633>
68. Hayden, C.G.J., Cross, S.E., Anderson, C., Saunders, N.A., & Roberts, M.S. (2005) Sunscreen Penetration of Human Skin and Related Keratinocyte Toxicity after Topical Application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 18(4), 170–174. <https://doi.org/10.1159/000085861>
69. Hung, C.F., Chen, W.Y., Aljuffali, I.A., Shih, H.C., & Fang, J.Y. (2014) The risk of hydroquinone and sunscreen over-absorption via photodamaged skin is not greater in senescent skin as compared to young skin: Nude mouse as an animal model. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.034>
70. Krishnan, R., Pradhan, S., Timares, L., Katiyar, S.K., Elmets, C.A., & Nordlund, T.M. (2006) Fluorescence of Sunscreens Adsorbed to Dielectric Nanospheres: Parallels to Optical Behavior on HaCat Cells and Skin. *Photochemistry and Photobiology*, 82(6), 1557–1565. <https://doi.org/10.1562/2006-02-08-RA-800>
71. Roussel, L., Gilbert, E., Salmon, D., Serre, C., Gabard, B., Haftek, M., Maibach, H.I., & Pirot, F. (2015) Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(2), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.026>
72. Sarveiya, V., Risk, S., & Benson, H.A.E. (2004) Skin penetration and systemic absorption of sunscreens after topical application. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(3), P75–P75. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.10.626>
73. Tippavajhala, V.K., Mendes, T.O., & Martin, A.A. (2018) In Vivo Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 19(2), 753–760. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0852-8>



# A review of the study of environmental modeling tools to understand the real impact of cosmetic products on environmental safety

## Revisão do estudo de ferramentas de modelagem ambiental para entender o real impacto dos produtos cosméticos na segurança ambiental

Caroline Inácio Bianchi and Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos  

**Keywords:** environmental modeling tools, environmental risk assessment, cosmetic products, environmental impact, formulation

**Palavras-chave:** ferramentas de modelagem ambiental, avaliação de risco ambiental, produtos cosméticos, impacto ambiental, formulação

### To Cite:

Bianchi, C. I. & Maia Campos, P. M. B. G. (2023) A review of the study of environmental modeling tools to understand the real impact of cosmetic products on environmental safety. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 126-135.

 [10.19277/bbr.20.1.312](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.312)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Avenida do Café, S/N, Ribeirão Preto - SP, 14040-9031

Correspondence to / Correspondência a:  
[pmcampos@usp.br](mailto:pmcampos@usp.br)

Received / Recebido: 18/04/2023  
Accepted / Aceite: 12/07/2023

### Abstract

In contrast to human health risk assessment, there are no definitive guidelines for environmental risk assessment of cosmetic products. The objective of this study was to perform an in-depth analysis of ten modeling environmental tools and to establish the best rationale to assess the impact on environmental safety considering the recent global pandemic scenario and the evolution of the consumer mindset. A literature analysis was performed for the ten modeling environmental tools, and when possible, each was downloaded for comparison. Chesar was the tool that proved to be the easiest to enter data, and it has the more straightforward and direct application steps; thus, it was chosen for the initial assessment of ingredients that demonstrate potential environmental hazards. For high-level tools, it was not possible to establish a comparison for choice, as the models are private and have little data in the literature. Even so, for a more detailed assessment after the first initial assessment via Chesar, iSTREEM could be used. This study delivers important knowledge about the modeling tools and how to establish a rationale for environmental risk assessment.

### Resumo

Em contraste com a avaliação de risco à saúde humana, não há diretrizes definitivas para avaliação de risco ambiental de produtos cosméticos. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise aprofundada de dez ferramentas de modelagem ambiental e estabelecer o melhor racional para avaliar o impacto na segurança ambiental considerando o recente cenário global de pandemia e evolução da mentalidade do consumidor. Foi realizada uma análise da literatura para as dez ferramentas ambientais de modelagem, sendo possível o download e comparação entre cada uma delas. O Chesar foi a ferramenta que se mostrou mais fácil para inserir dados e tem as etapas de aplicação mais claras e diretas e foi escolhida para a avaliação inicial de ingredientes que demonstram potenciais riscos ambientais. Para ferramentas de alto nível, não foi possível estabelecer comparação para escolha, pois os modelos são particulares e possuem poucos dados na literatura. Mesmo assim, para uma avaliação mais detalhada após a primeira avaliação inicial via Chesar, o iSTREEM pode ser usado. Este estudo fornece conhecimentos importantes sobre as ferramentas de modelagem e como estabelecer um racional para a avaliação de risco ambiental.

## Introduction

From the twentieth century, the period in which cosmetic products gained market share, to the current context, a natural evolution in consumer mentality could be observed. Over the years, the concern becomes not only with the cosmetic efficacy of the product, but also with the human and environmental safety of the products purchased, and the cosmetic industries need to be aware of these and other new needs (1).

To understand the evolution of the mindset over the years, as well as the current mentality, it is necessary to understand the context in which the consumer is inserted because, although consumption is habitual, it is also contextual and governed by the characteristics of the period.

There are four main contexts that interfere in the change of consumption habits: (1) change in the social context; (2) technological; (3) rules and regulations and, (4) natural disasters such as earthquakes, hurricanes, and global pandemics such as the Covid-19 pandemic we have experienced. All these contexts can significantly interfere with both consumption and production and the supply chain (2), and, specifically discussing the pandemic caused by the Coronavirus SARS-CoV-2, impacts and changes in consumption habits have been observed since March 2020.

According to the World Health Organization, one of the actions that helps prevent the disease is frequent and thorough hand hygiene, with soap and water or the use of hand sanitizers (3). The contagious nature of the new virus has raised awareness about the importance of personal hygiene, which may explain, for example, the 80% increase in spending on personal hygiene products in the same period in Australia (4) and understanding how hand washing behavior can suggest health knowledge (5), helping to prevent contagious diseases. Corroborating this fact, a recent Euromonitor survey (2021) indicates a growth in the frequency of liquid soap use across different continents and points out how the consumer today is "obsessed" with safety (6).

In addition to the high demand for personal hygiene products such as soaps, the opportunity for other hand products has emerged, especially those that offer repairing or healing benefits (7), as excessive

## Introdução

A partir do século XX, período em que os produtos cosméticos ganharam mercado, até ao contexto atual, pôde-se observar uma evolução natural na mentalidade do consumidor. Com o passar dos anos, a preocupação passa a ser não só com a eficácia cosmética do produto, mas também com a segurança humana e ambiental dos produtos adquiridos e as indústrias cosméticas precisam estar atentas a essas e outras novas necessidades (1).

Para entender a evolução da mentalidade ao longo dos anos, assim como a mentalidade atual, é necessário entender o contexto em que o consumidor está inserido, pois, embora o consumo seja habitual, ele também é contextual e regido pelas características de cada época.

Existem quatro contextos principais que interferem na mudança dos hábitos de consumo: (1) mudança no contexto social; (2) tecnológico; (3) regras e regulamentos e (4) desastres naturais como terremotos, furacões e pandemias globais como a pandemia de Covid-19 que vivemos. Todos esses contextos podem interferir significativamente tanto no consumo quanto na produção e na cadeia de suprimentos (2) e, especificamente discutindo a pandemia, provocada pelo Coronavírus SARS-CoV-2, impactos e mudanças nos hábitos de consumo são observados desde março de 2020.

Uma das ações que auxiliam na prevenção da doença é a higienização frequente e completa das mãos, com água e sabão ou uso de desinfetantes para as mãos, segundo a Organização Mundial da Saúde (3). A natureza contagiosa do novo vírus aumentou a conscientização sobre a importância da higiene pessoal, o que pode explicar, por exemplo, o aumento de 80% nos gastos com produtos de higiene pessoal no mesmo período na Austrália (4) e entender como a lavagem das mãos o comportamento pode sugerir conhecimentos de saúde (5), auxiliando na prevenção de doenças contagiosas. Corroborando com esse fato, uma pesquisa recente da Euromonitor (2021) indica um crescimento na frequência de uso de sabonetes líquidos em diferentes continentes e aponta como o consumidor hoje está "obcecado" por segurança (6).

Além da alta demanda por produtos de higiene pessoal, como sabonetes, surgiu a oportunidade de outros produtos para as mãos, principalmente aqueles que oferecem benefícios reparadores ou cicatrizantes (7), pois o uso excessivo de produtos de higiene e

use of hygiene and cleaning products can damage the skin barrier function, increasing transepidermal water loss (TEWL), favoring the appearance of skin irritations (8).

Thus, the emphasis on hand care during the pandemic period led to an increase in the use of liquid soaps and hand moisturizers and, consequently, an increase in consumer and environmental exposure to the ingredients of these formulations, which can directly impact human and environmental safety. Given this scenario, it is of great importance to conduct studies aimed at meeting the new needs of consumers, as well as ensuring human and environmental safety in the face of new exposure.

The theoretical evaluation of ingredients for human and environmental safety and the choice of ingredients for cosmetic formulations begins with the study of the toxicological profile (hazard), analyzing all possible toxicological results for each ingredient used in the formulation. The mode of use of the product, the exposure, and the target audience are then considered. After that, risk assessment is required (9), starting from hazard identification, dose-response assessment, exposure assessment, and risk characterization calculating the margin of safety and quantitative comparisons. Robust guidelines exist for human safety risk assessment, (9,10). However, there are no well-defined guidelines for environmental risk assessment.

Due to differences in socioeconomic and environmental factors, including product use, wastewater treatment infrastructure, and dilution in receiving waters, large spatial variations in exposure to these "down-the-drain" wastewater chemicals are expected between countries and regions, and even within the same basin (11). Therefore, it is extremely challenging to map and perform an environmental risk assessment for all scenarios.

Alternatively, to understand the potential environmental hazards of cosmetic product ingredients, modeling approaches can be used to provide predicted environmental concentrations (PECs) of ingredients and provide a means to perform an environmental risk assessment by comparing PECs with toxicity thresholds for Predicted No-Effect Concentrations (PNECs)

limpeza pode danificar a pele função de barreira, aumentando a perda de água transepidermica (TEWL), favorecendo o aparecimento de irritações cutâneas (8).

Assim, a ênfase nos cuidados com as mãos durante o período de pandemia proporcionou aumento do uso de sabonetes líquidos e hidratantes para as mãos e, conseqüentemente, aumento da exposição do consumidor e do meio ambiente aos ingredientes dessas formulações, o que pode impactar diretamente na segurança humana e ambiental. Diante desse cenário, é de grande importância a realização de estudos que visem atender às novas necessidades dos consumidores, bem como garantir a segurança humana e ambiental diante da nova exposição.

A avaliação teórica dos ingredientes quanto à segurança humana e ambiental e escolha dos ingredientes para formulações cosméticas inicia-se com o estudo do perfil toxicológico (risco), analisando todos os resultados toxicológicos possíveis para cada ingrediente utilizado na formulação. A seguir, considera-se o modo de uso do produto, a exposição e o público-alvo. Depois disso, a avaliação de risco é necessária (9), a partir da identificação de perigo, avaliação dose-resposta, avaliação de exposição e caracterização de risco, calculando a margem de segurança e comparações quantitativas. Para a avaliação do risco de segurança humana, existem diretrizes robustas (9,10). No entanto, para avaliação de risco ambiental não há diretrizes bem definidas.

Devido às diferenças nos fatores socioeconômicos e ambientais, incluindo uso do produto, infraestrutura de tratamento de esgoto e diluição nas águas receptoras, grandes variações espaciais na exposição a esses produtos químicos de esgoto são esperadas entre países e regiões, e até mesmo dentro da mesma bacia (11). Portanto, é extremamente desafiador mapear e realizar uma avaliação de risco ambiental para todos os cenários.

Alternativamente, para entender os perigos ambientais potenciais dos ingredientes de produtos cosméticos, abordagens de modelagem podem ser usadas para fornecer concentrações ambientais previstas (CAPs) de ingredientes e fornecer um meio para realizar uma avaliação de risco ambiental comparando CAPs com limites de toxicidade para os quais as concentrações de efeitos não previstos (CENP).

In the cosmetic scenario, formulations are known to be continuously introduced into aquatic systems and, unlike pharmaceutical products, for example, cosmetic products present ecological risks of greater perseverance due to their continuous use throughout life and that they are not metabolized prior to exposure.

According to the last Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) workshop in 2016, there are ten environmental modeling tools that can perform an environmental risk assessment: E-FAST (USA), EUSES (EU), Chesar (EU), CRAM (Canada), HydroROUT CFM (St. Lawrence R.), GREAT-ER (Europe), STREAM-EU (Europe), ScenAT (World), PhATE™ (USA), iSTREEM® (USA + Ontario).

In this context, the aim of this study was to perform an in-depth analysis of these ten environmental modeling tools and establish the best rationale for assessing the impact on environmental safety considering the recent global scenario and contributing to the development of safer cosmetics for humans and the environment.

The ten methodologies were studied through the literature, using articles, tool manuals and environmental safety assessment guides, such that each type of model could be understood. After that, some modeling tools could be downloaded to compare and analyze against the ECHA (European Chemical Agency) Guidance.

Finally, it was possible to choose one screening model for initial risk assessment and a high-level model for in-depth risk assessment.

This study had an innovative proposal, as it presented the study and comparison of ten environmental modeling tools that can assist in the environmental risk assessment required by the European Directive and the new mindset of cosmetic product consumers.

In this context, this study brings an important contribution by proposing a complete rationale for environmental risk assessment, considering the study of computational models and contributing to the development of safer cosmetics for humans and the environment.

No cenário cosmético, sabe-se que as formulações são continuamente introduzidas nos sistemas aquáticos e, diferentemente dos produtos farmacêuticos, por exemplo, os produtos cosméticos apresentam riscos ecológicos de maior perseverança devido ao seu uso contínuo ao longo da vida e não metabolizados antes da exposição.

De acordo com o último workshop do SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) em 2016, existem dez ferramentas de modelagem ambiental que podem realizar uma avaliação de risco ambiental: E-FAST (EUA), EUSES (UE), Chesar (UE), CRAM (Canadá), HydroROUT CFM (St. Lawrence R.), GREAT-ER (Europa), STREAM-EU (Europa), ScenAT (Mundo), PhATE™ (EUA), iSTREEM® (EUA + Ontário).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise aprofundada de dez ferramentas de modelagem ambiental e estabelecer a melhor justificativa para avaliar o impacto na segurança ambiental considerando o recente cenário global e contribuindo para o desenvolvimento de cosméticos mais seguros para o ser humano seres e para o meio ambiente.

As dez metodologias foram estudadas por meio da literatura - artigos, manuais das ferramentas e guias de avaliação de segurança ambiental, e foi compreendido cada tipo de modelo. Depois disso, algumas ferramentas de modelagem puderam ser baixadas para comparar e analisar frente à diretriz da ECHA (Agência Europeia dos Produtos Químicos / *European Chemical Agency*).

No final foi possível escolher um modelo de triagem para avaliação de risco inicial e um modelo de alto nível para avaliação de risco profunda.

Este estudo teve uma proposta inovadora, pois apresentou o estudo e comparação de dez ferramentas de modelagem ambiental que podem auxiliar na avaliação do risco ambiental exigido pela Diretiva Europeia e pela nova mentalidade dos consumidores de produtos cosméticos.

Nesse contexto, este estudo traz uma importante contribuição ao propor um racional completo para avaliação de risco ambiental, considerando o estudo de modelos computacionais e contribuindo para o desenvolvimento de cosméticos mais seguros para o ser humano e para o meio ambiente.

### Materials and methods

Based on the literature review, modeling tools were studied and divided into two groups:

- Screening models: conservative assessment that standardizes the data.
- High-level models: detailed assessment that requires more information about the location to be evaluated.

With the studies of ECHA literature, it was possible to understand the four steps needed to make the environmental risk assessment: Input, Estimation of substance release, Environmental distribution and Risk characterization, in addition to other parameters, as indicated in Figure 1.

Whether the tools follow the steps of ECHA on environmental risk assessment for chemicals was analyzed as a parameter.

The downloads could be made for the screening models and all the necessary inputs and parameters considered for each were tabulated for comparison.

The study of the high-tier models was based on literature, as they are private models.

### Materiais e métodos

Com base na análise da literatura, as ferramentas de modelagem foram estudadas e divididas em dois grupos:

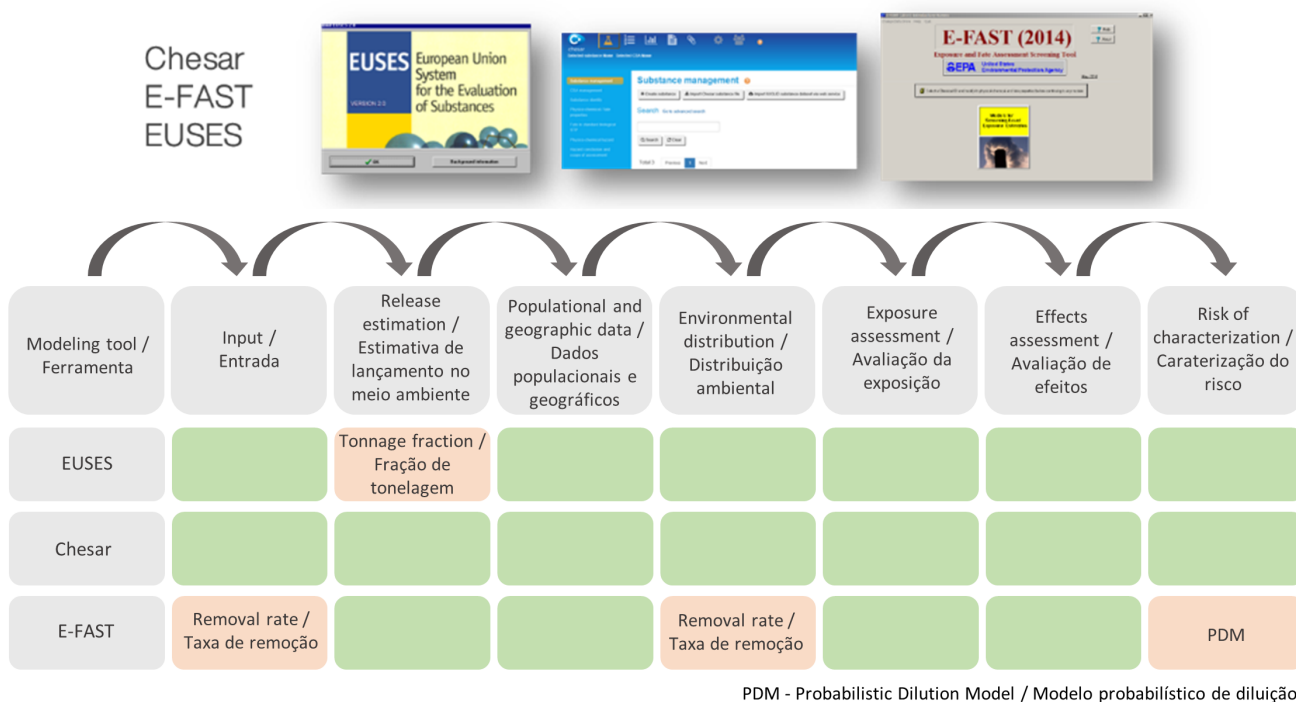
- Modelos de triagem: avaliação conservadora que padroniza os dados.
- Modelos de alto nível: avaliação detalhada que requer mais informações sobre o local a ser avaliado.

Com os estudos da literatura da ECHA, foi possível compreender as quatro etapas necessárias para fazer a avaliação de risco ambiental: Entrada, Estimativa de liberação da substância, Distribuição ambiental e Caracterização do risco, além de outros parâmetros, conforme indicado na Figura 1.

Como parâmetro, foi analisado se as ferramentas seguem os passos da ECHA sobre avaliação de risco ambiental para produtos químicos.

O *download* pôde ser feito para os modelos de triagem e todas as entradas e parâmetros necessários considerados para cada um foram tabulados para comparação.

Para modelos de alto nível o estudo se baseou na literatura por serem modelos privados.



**Figure 1** - Comparison of screening models under the evaluation parameters.  
**Figura 1** - Comparação de modelos de triagem sob os parâmetros de avaliação.

## Results and discussion

The ten environmental modeling tools studied follow the European Chemicals Agency Guidance on information requirements and chemical safety assessment (12): environmental exposure assessment is initially based on the evaluation of information on the relevant properties of the substance (physicochemical properties, fate and (eco)toxicological), subsequently on hazard assessment and use mapping.

At a minimum, vapor pressure, water solubility, molecular weight, octanol-water partition coefficient, melting point, and impact of biodegradability on the fate of the substance in the environment are the information necessary for the estimation of environmental exposure.

For the EUSES, Chesar and E-FAST screening models, the four steps for environmental risk assessment could be analyzed in detail:

1. Input data: inclusion in the tools of data identifying the analyte (e.g., molecular weight, partition coefficient, etc.):

In addition to the minimum data reported above, E-FAST requires the removal of effluent treatment for each substance. These data are not easy to find and usually require other tools to obtain them, which makes E-FAST the complex model at this step.

EUSES does not require as complex data as E-FAST, but it requires a great deal of information to run.

On the other hand, in Chesar (an evolution tool of EUSES), all the data may be entered through IUCLID (International Uniform Chemical Information Database - ECHA database), making it the best tool for this step.

2. Estimated release of the substance: considers the amount of use and the exposed population:

EUSES was found to be the most complex tool in this step because while the other modeling tools need only the annual production volume, it needs other data to make an estimate, such as tonnage and chemical analysis.

E-FAST uses the 2003 US population, and this information was considered out-of-date. Thus, Chesar once again was the best model at this stage.

## Resultados e discussão

As dez ferramentas de modelagem ambiental estudadas seguem a Orientação da Agência Europeia de Produtos Químicos sobre requisitos de informação e avaliação de segurança química (12): a avaliação da exposição ambiental é inicialmente baseada na avaliação de informações sobre as propriedades relevantes da substância (propriedades físico-químicas, destino e (eco)toxicológico), posteriormente na avaliação de perigos e mapeamento de usos.

No mínimo, pressão de vapor, solubilidade em água, peso molecular, coeficiente de partição octanol-água, ponto de fusão e impacto da biodegradabilidade no destino da substância no meio ambiente são as informações necessárias para a estimativa da exposição ambiental.

Para os modelos de triagem EUSES, Chesar e E-FAST, foi possível analisar detalhadamente as quatro etapas para avaliação de risco ambiental:

1. Dados de entrada: inclusão nas ferramentas de dados que identificam a substância a ser analisada (por exemplo, peso molecular, coeficiente de partição, etc):

Além dos dados mínimos informados acima, o E-FAST exige a remoção do tratamento de efluentes para cada substância. Esses dados não são fáceis de encontrar e geralmente requerem outras ferramentas para obtê-los, o que torna o E-FAST o modelo complexo nessa etapa.

O EUSES não demanda dados tão complexos quanto o E-FAST, mas demanda muita informação para rodar.

Por outro lado, no Chesar (uma ferramenta de evolução da EUSES) é possível inserir todos os dados através da IUCLID (*International Uniform Chemical Information Database* - base de dados da ECHA), tornando-se a melhor ferramenta para esta etapa.

2. Estimativa de liberação da substância: considera a quantidade de uso e a população exposta:

A EUSES foi considerada a ferramenta mais complexa nesta etapa porque enquanto as outras ferramentas de modelagem precisam apenas do volume anual de produção, ela precisa de outros dados para fazer uma estimativa, como tonelagem e análise química.

O E-FAST usa a população americana de 2003 e esta informação foi considerada antiga. Assim, Chesar mais uma vez foi o melhor modelo nesta etapa.

3. Environmental distribution: considers the location where the substance is disposed:

In addition to effluent removal treatment for each substance, E-FAST requires river flow and is another complex data compared to EUSES and Chesar.

4. Risk characterization: Based on the data reported in Steps 1, 2 and 3, the tools compare actual exposure with ideal exposure:

The risk characterization is different for these tools. While EUSES and Chesar make an environmental risk assessment based on the calculation of the CAP/CENP value, E-FAST uses a program that the assessor needs to enter the days of the period, and the program will determine how often the stream receiving the concentration will exceed the level of concern (LDC).

For the high-level assessment tools (CRAM (Canada), HydroROUT CFM (St. Lawrence R.), GREAT-ER (Europe), STREAM-EU (Europe), ScenAT (World), PhATE™ (USA), iSTREEM® (USA + Ontario)), there are often common assumptions shared and similar key modeling mechanisms. But while in screening models removal and dilution rates are fixed and the worst case scenario is considered, it is possible to modify such factors in the high-level models (13).

A detailed assessment covering the four steps of environmental risk assessment could not be performed as the only one available for download and testing was iSTREEM®.

iSTREEM® is a free tool, a web-based GIS model that estimates the concentration of a chemical going down the drain and the residual levels that subsequently enter the aquatic environment. This publicly available tool can be used to enhance the researcher's ability to estimate chemical concentrations in wastewater treatment plant effluents, surface waters and in many drinking water outlets under mid and low flow conditions. The computer model covers over 240,000 river miles in the United States and includes 13,300 wastewater treatment plants and 1,700 municipal drinking water facilities downstream of the treatment plants (14, 15).

3. Distribuição ambiental: considera o local onde a substância é descartada:

E-FAST, além do tratamento de remoção de efluentes para cada substância requer fluxo de rio e é outro dado complexo comparando com EUSES e Chesar.

4. Caracterização do risco: Com base nos dados relatados em 1, 2 e 3, as ferramentas comparam a exposição real com a exposição ideal:

A caracterização do risco é diferente para essas ferramentas. Enquanto a EUSES e a Chesar fazem avaliação de risco ambiental com base no cálculo do valor CAP/CENP, o E-FAST usa um programa que o avaliador precisa inserir os dias do período e o programa vai determinar com que frequência o córrego que recebe a concentração vai ultrapassar o nível de preocupação (PMD).

Para as ferramentas de avaliação de alto nível (CRAM (Canadá), HydroROUT CFM (St. Lawrence R.), GREAT-ER (Europa), STREAM-EU (Europa), ScenAT (Mundo), PhATE™ (EUA), iSTREEM® (EUA + Ontário)), muitas vezes há suposições comuns compartilhadas e mecanismos de modelagem chave semelhantes. Mas, enquanto nos modelos de triagem as taxas de remoção e diluição são fixas e o pior cenário é considerado, nos modelos de alto nível é possível modificar tais fatores (13).

Uma avaliação detalhada abrangendo as 4 etapas da avaliação de risco ambiental não pode ser realizada, pois o único disponível para *download* e teste foi o iSTREEM®.

iSTREEM® é uma ferramenta gratuita, modelo GIS baseado na *web* que estima a concentração de um produto químico que desce pelo ralo e os níveis residuais que subsequentemente entram no ambiente aquático. Esta ferramenta disponível publicamente pode ser usada para melhorar o pesquisador para estimar as concentrações químicas em efluentes de estações de tratamento de águas residuais, águas superficiais e em muitas saídas de água potável em condições de fluxo médio e baixo. O modelo de computador abrange mais de 240.000 milhas fluviais nos Estados Unidos e inclui 13.300 estações de tratamento de águas residuais e 1.700 instalações municipais de água potável a jusante das estações de tratamento (14, 15).

For the model to calculate the PEC, the user must include:

- the geographical extent to be assessed.
- the charge factor (per person usage rate - g/person/day).
- the removal of wastewater treatment.
- the decomposition rate in the river (k/day).
- the water flow (medium or low).

Wastewater treatment removal can be achieved through another exposure model called *SimpleTreat*.

The safety assessment starts from the worst-case scenario, and later, if necessary, a more detailed analysis is done for validation.

Thus, even though it was not possible to study the high-level models in depth, the knowledge of the existence of each was of extreme importance for possible future partnerships.

iSTREEM® is a complete and ideal tool for an in-depth environmental safety assessment, should the need arise. That is, if the ingredient is of high environmental risk after the worst-case assessment performed with the screening tools, a more detailed assessment is possible via iSTREEM to understand the impact, considering different dilutions and different geographic locations.

## Conclusion

These results of comparison of environmental modeling tools are unprecedented in the literature and provide the perspective information that can help in the development of safer cosmetics considering the recent exposure scenario.

With this study it was possible to perform detailed evaluation and comparison between environmental modeling screening tools.

The EUSES tool is an old system and is not easy to use, requiring many inputs for evaluation. The E-FAST tool, despite having the closest exposed population to Brazil, uses older (2003 date) and complex data such as effluent treatment removal for each substance. It is also not as complete as EUSES.

Para o modelo calcular o CAP, o usuário deve incluir:

- A extensão geográfica a ser avaliada.
- Fator de cobrança (taxa de utilização por pessoa – g/pessoa/dia).
- Remoção de tratamento de águas residuais.
- Taxa de decomposição no rio (k/dia).
- Selecione o fluxo de água (médio ou baixo).

A remoção do tratamento de águas residuais pode ser alcançada por meio de outro modelo de exposição chamado *SimpleTreat*.

A avaliação de segurança parte do pior cenário e, posteriormente, se necessário, é feita uma análise mais detalhada para validação.

Dessa forma, mesmo não sendo possível estudar a fundo os modelos de alto nível, o conhecimento da existência de cada um deles foi de extrema importância para possíveis parcerias futuras.

O iSTREEM® é uma ferramenta completa e ideal para uma avaliação aprofundada da segurança ambiental, caso seja necessário. Ou seja, se após a avaliação de pior caso realizada com as ferramentas de triagem, o ingrediente for de alto risco ambiental, existe a possibilidade de uma avaliação mais detalhada via iSTREEM e entendimento do impacto, considerando diferentes diluições e diferentes localizações geográficas.

## Conclusão

Esses resultados de comparação de ferramentas de modelagem ambiental são inéditos na literatura e fornecem as informações de perspectivas que podem ajudar no desenvolvimento de cosméticos mais seguros considerando o recente cenário de exposição.

Com este estudo foi possível realizar avaliação detalhada e comparação entre as ferramentas de modelagem ambiental de triagem.

A ferramenta EUSES é um sistema antigo e não é fácil de usar, exigindo muitos insumos para avaliação. A ferramenta E-FAST, apesar de ter a população exposta mais próxima do Brasil, possui dados antigos (data de 2003) e complexos como a remoção do tratamento de efluentes para cada substância. Também não é tão completo quanto o EUSES.



Finally, Chesar is a tool that facilitates data entry. It was considered the easiest tool to use and has clearer and more straightforward application steps. Among the screening tools, the Chesar tool was chosen for the initial assessment of ingredients that demonstrate potential environmental risk.

For the high-level environmental modeling tools, it was not possible to establish a comparison between the chosen models, as the models are private and have little data in the literature. Still, following the rational safety assessment, for a more detailed assessment after the first initial assessment via Chesar, iSTREEM can be used.

### **Author contributions**

All the study was conducted by Caroline Inácio Bianchi and Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos. Both researchers were responsible for the contextualization. Caroline was responsible for both the experimental and writing, while Patrícia was responsible for the supervision of the study and revision of the article.

### **Acknowledgements**

The discussion of this work was supported by Natura&Co LATAM, who has great knowledge on the subject.

### **Conflicts of Interest**

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

Finalmente, Chesar é uma ferramenta que facilita a entrada de dados. Foi considerada a ferramenta mais fácil de usar e possui etapas de aplicação mais claras e diretas. Dentre as ferramentas de projeção, a ferramenta Chesar foi escolhida para a avaliação inicial de ingredientes que demonstram potencial risco ambiental.

Para as ferramentas de modelagem ambiental de alto nível, não foi possível estabelecer uma comparação entre os modelos escolhidos, pois os modelos são privados e possuem poucos dados na literatura. Ainda assim, seguindo a avaliação racional de segurança, para uma avaliação mais detalhada após a primeira avaliação inicial via Chesar, pode-se utilizar o iSTREEM.

### **Contribuição dos autores**

Todo o estudo foi conduzido por Caroline Inácio Bianchi e Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos. Ambas as pesquisadoras foram responsáveis pela contextualização. Caroline foi responsável pela parte experimental e escrita, enquanto Patrícia foi responsável pela supervisão do estudo e revisão do artigo..

### **Agradecimentos**

A discussão deste trabalho contou com o apoio da Natura&Co LATAM que possui grande conhecimento sobre o assunto.

### **Conflito de Interesses**

A Editora presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de revisão e/ou decisão. As autoras declararam não possuir quaisquer relações financeiras ou que possam configurar um potencial conflitos de interesse.

## References / Referências

1. Maia, J. I. B. (2017). Innovation in cosmetics-innovative makeup products: efficacy and safety. [Integrated Master's Degree, University of Lisbon Faculty of Pharmacy]. University of Lisbon Repository. [https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/36037/1/MICF\\_Joana\\_Maia.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/36037/1/MICF_Joana_Maia.pdf)
2. Sheth J. (2020). Impact of Covid-19 on consumer behavior: Will the old habits return or die?. *Journal of business research*, 117, 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2020.05.059>
3. WHO (World Health Organization). Coronavirus disease (COVID-19) advice for the public. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public>, accessed 28 June 2022.
4. Loxton, M., Truskett, R., Scarf, B., Sindone, L., Baldry, G., & Zhao, Y. (2020). Consumer behaviour during crises: preliminary research on how coronavirus has manifested consumer panic buying, herd mentality, changing discretionary spending and the role of the media in influencing behavior. *Journal of Risk and Financial Management*, 13(8), 166. <https://www.mdpi.com/1911-8074/13/8/166>
5. Duan, Y., Shang, B., Liang, W., Lin, Z., Hu, C., Baker, J. S., Wang, Y., & He, J. (2022). Predicting hand washing, mask wearing and social distancing behaviors among older adults during the covid-19 pandemic: an integrated social cognition model. *BMC geriatrics*, 22(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-02785-2>.
6. Westbrook, G., & Angus, A. TOP 10 GLOBAL CONSUMER TRENDS 2021. Euromonitor International, 2021. Available at: <https://go.euromonitor.com/white-paper-EC-2021-Top-10-Global-Consumer-Trends.html>, accessed 18 April 2021.
7. Mogelonsky, M. "A pandemia do Covid-19 chegou: Como os consumidores e as indústrias estão reagindo nos EUA?". MINTEL. Available at: <https://brasil.mintel.com/blog/a-pandemia-do-covid-19-chegou-como-os-consumidores-e-as-industrias-estao-reagindo-nos-eua>, accessed 10 September 2020.
8. Cadioli, G.F. & Campos, P. M. (2020). "Os Cosméticos em Tempos de Pandemia". *Cosmetics & Toiletries (Brasil)*, 32 (5), 40-41.
9. SCCS members, & Other experts (2021). The SCCS Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 11th revision, 30-31 March 2021, SCCS/1628/21. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 127, 105052. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105052>
10. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2ª edition* (2012). ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf>
11. Keller, V. D., Williams, R. J., Lofthouse, C., & Johnson, A. C. (2014). Worldwide estimation of river concentrations of any chemical originating from sewage-treatment plants using dilution factors. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(2), 447–452. <https://doi.org/10.1002/etc.2441>
12. ECHA. (2016) Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R. 16: Environmental exposure assessment.
13. Grill, G., Li, J., Khan, U., Zhong, Y., Lehner, B., Nicell, J., & Ariwi, J. (2018). Estimating the eco-toxicological risk of estrogens in China's rivers using a high-resolution contaminant fate model. *Water research*, 145, 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.053>
14. Wang, X., Homer, M., Dyer, S. D., White-Hull, C., & Du, C. (2005). A river water quality model integrated with a web-based geographic information system. *Journal of environmental management*, 75(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.11.025>
15. Kapo, K. E., DeLeo, P. C., Vamshi, R., Holmes, C. M., Ferrer, D., Dyer, S. D., Wang, X., & White-Hull, C. (2016). iSTREEM(®) : An approach for broad-scale in-stream exposure assessment of "down-the-drain" chemicals. *Integrated environmental assessment and management*, 12(4), 782–792. <https://doi.org/10.1002/ieam.1793>

# Impact of controlled pharmacist communication-based interventions on patient adherence to antibiotics: a protocol of a systematic review

## Impacto de intervenções farmacêuticas controladas na adesão do doente aos antibióticos: protocolo de uma revisão sistemática

Carla Pires  

**Keywords:** pharmacy, antibiotics patient adherence, communication-based interventions, protocol

**Palavras-chave:** farmácia, antibióticos, adesão do doente, intervenções baseadas em comunicação, protocolo

### To Cite:

Pires, C. (2023) Impact of controlled pharmacist communication-based interventions on patient adherence to antibiotics: a protocol of a systematic review. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 136-149.

 [10.19277/bbr.20.1.314](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.314)

CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
[p5558@ulusofona.pt](mailto:p5558@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 17/05/2023  
Accepted / Aceite: 05/07/2023

### Abstract

Community and hospital pharmacists are prepared to educate or involve patients in specific interventions/programs aiming at improving antibiotic adherence. Importantly, improved antibiotic adherence is associated with the reduction of the risk of antibiotic resistance. Pharmacist communication-based interventions to improve patients' antibiotic adherence are diverse, such as interviews, education/counselling, the provision of written information or workshops, knowledge assessment, among others. Thus, a protocol of a systematic review to evaluate the impact of pharmacist communication-based interventions on patients' adherence to antibiotics is presented. The PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses for systematic review protocols) was applied. The detailed project of the present systematic review is already published in Registry Services – Open Science Framework (OSF). The confirmation of a positive impact of communication-based interventions on patients' antibiotic adherence in community or hospital pharmacies is expected.

### Resumo

Os farmacêuticos comunitários e hospitalares estão preparados para educar ou envolver os doentes em intervenções/programas específicos com o objetivo de melhorar a adesão aos antibióticos. É importante salientar que uma melhor adesão ao tratamento com antibióticos está associada à redução do risco de resistências. As intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação para melhorar a adesão dos doentes aos antibióticos são diversificadas, como entrevistas, educação/aconselhamento ou fornecimento de informações escritas ou workshops, avaliação de conhecimento, entre outras. Assim, é apresentado um protocolo de uma revisão sistemática para avaliar o impacto das intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação na adesão dos doentes aos antibióticos. O PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses for systematic review protocols) foi aplicado. O projeto detalhado da presente revisão sistemática já está publicado nos Serviços de Registro – Open Science Framework (OSF). Antecipa-se a confirmação de um impacto positivo na adesão dos doentes aos antibióticos em farmácias comunitárias ou hospitalares decorrente das intervenções baseadas na comunicação.

## Introduction

Antimicrobial resistance occurs when patients' infections do not respond to treatment with medicines, such as antibiotics, antivirals, antiprotozoals or antifungals. Antimicrobial resistances are likely to increase in the next decades, which can result in increased difficulty in the treatment of patients, spread of infections, development of severe illness and death. Antimicrobial resistance is one of the main global public health threats, responsible for millions of deaths, the worsening of infirmities and/or increased costs for the national health systems worldwide. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Pneumococcus* are among the emergent resistant bacteria (1).

The inappropriate use of antimicrobial medicines may lead to resistances, because of incorrect selection, inadequate dosing, or poor patient adherence. Therefore, patient adherence to antibiotics is among the determinant factors to avoid antimicrobial resistance, i.e., taking the antibiotic in the correct dose, at the right time and for the prescribed period (2).

Pharmacists are required (i) to dispense the prescribed antimicrobials, (ii) to ensure the patients' comprehension regarding the dosage, frequency and duration of treatment, (iii) to actively participate in the disposal of unused antibiotics, (iv) to report adverse drug reactions, (v) to provide information and clarify doubts about the precautions, contraindications and interactions of antimicrobials, or (vi) to participate in public health programs/campaigns about the rational use of antibiotics (3). However, according to the results the systematic review of Lambert et al. (2022): "adherence to antibiotics did not significantly increase after pharmacist-led interventions" (4).

Thus, the primary and secondary objectives as well as the research questions of the present systematic review are, as follows:

- To evaluate the impact of pharmacist communication-based interventions on patients' adherence to antibiotics (primary objective).
- To identify different types of pharmacist communication-based interventions to improve antibiotic adherence (secondary objective).

## Introdução

A resistência antimicrobiana ocorre quando as infecções dos doentes não respondem ao tratamento com medicamentos, como antibióticos, antivirais, antiprotozoários ou antifúngicos. Nas próximas décadas, é expectável um aumento das resistências antimicrobianas, o que pode resultar numa maior dificuldade no tratamento dos doentes, disseminação de infeções, desenvolvimento de doenças graves e morte. As resistências antimicrobianas são uma das principais ameaças globais de saúde pública, as quais são responsáveis por milhões de mortes, agravamento de doenças e/ou aumento dos custos com os sistemas nacionais de saúde em todo o mundo. Entre as bactérias resistentes emergentes estão a *Escherichia coli*, a *Salmonella* e os *Pneumococos* (1).

O uso inadequado de medicamentos antimicrobianos pode levar ao aparecimento de resistências devido a uma seleção incorreta de antibióticos/antimicrobianos, dosagens inadequadas ou baixa adesão do doente. Pelo que, a adesão do doente aos antibióticos está entre os fatores determinantes para evitar estas resistências, i.e., toma do antibiótico numa dose correta, no horário certo e durante o tempo prescrito (2).

Os farmacêuticos devem: (i) dispensar os antimicrobianos prescritos, (ii) assegurar que o doente compreende a informação sobre a dosagem, frequência e duração do tratamento, (iii) participar ativamente na reciclagem de antibióticos não utilizados, (iv) notificar reações adversas, (v) fornecer informações e esclarecer dúvidas sobre as contraindicações e interações dos antibióticos, ou (vi) participar em programas/campanhas de saúde pública sobre o uso racional destes medicamentos (3). No entanto, de acordo com os resultados da revisão sistemática de Lambert et al. (2022): "a adesão aos antibióticos não aumentou significativamente após as intervenções farmacêuticas" (4).

Assim, os objetivos primários e secundários, bem como as respetivas questões de investigação da presente revisão sistemática são os seguintes:

- Avaliar o impacto das intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação na adesão dos doentes aos antibióticos (objetivo primário).
- Identificar os diferentes tipos de intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação para melhorar a adesão aos antibióticos (objetivo secundário).

**Table 1** - PICO framework applied to the present protocol  
**Tabela 1** - Estrutura PICO aplicada ao presente protocolo

Population / População	Intervention / Intervenção	Comparison / Comparação	Outcomes / Desfechos
Pharmacists from a community or hospital pharmacy / Farmacêuticos comunitários ou hospitalares  Patients taking an antibiotic / Doentes a tomar um antibiótico	Pharmacist communication-based interventions / Intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação	Controlled trial (control group vs. group of patients enrolled in a pharmacist communication-based intervention) / Ensaio controlado (grupo de controle vs. grupo de doentes numa intervenção farmacêutica baseada em comunicação)	Impact on patients' antibiotic adherence (primary outcome) / Impacto na adesão dos doentes aos antibióticos (outcome/desfecho principal)  <b>Secondary outcomes / Desfechos/outcomes secundários:</b>  (i) Patient satisfaction with antibiotic adherence / Satisfação do doente com a adesão aos antibióticos;  (ii) Patient perception about antibiotic adherence / Perceção do doente sobre adesão aos antibióticos;  (iii) Patient knowledge about antibiotic adherence; and / Conhecimento do doente sobre adesão aos antibióticos;  (iv) Patient comprehension about antibiotic adherence / Compreensão do doente sobre a adesão aos antibióticos.

#### *Inclusion and exclusion criteria*

Inclusion criteria: patients taking an antibiotic enrolled in a controlled trial (control group vs. communication-based pharmacist intervention group). This controlled trial must be carried out in a community or hospital pharmacy, aiming to evaluate the impact of pharmacist communication-based intervention on patients' antibiotic adherence. Only original and peer-reviewed papers will be included (without time limitations). Exclusion criteria: published papers not written in English, Spanish, Portuguese, French or Italian. Commentaries, reviews, qualitative studies, abstracts, letters to editor, and preprints and interventions conducted by technicians or researchers under the direct supervision of a hospital or community pharmacist will also be excluded.

#### *Crítérios de inclusão e exclusão*

Crítérios de inclusão: estudos efetuados numa farmácia comunitária ou hospitalar, em que os doentes a tomar antibióticos foram incluídos num estudo controlado (grupo controle vs. grupo de intervenção baseada em comunicação), cujo objetivo é avaliar o impacto da intervenção farmacêutica baseada na comunicação na adesão à toma de antibióticos pelos doentes. Somente artigos originais e revistos por pares serão incluídos (sem limites de tempo). Crítérios de exclusão: artigos publicados, que não estejam escritos em inglês, espanhol, português, francês ou italiano. Comentários, revisões, estudos qualitativos, resumos, cartas ao editor e preprints e intervenções conduzidas por técnicos ou investigadores sob a supervisão direta de um farmacêutico hospitalar ou comunitário também serão excluídas.

### *Databases, Keywords, and MeSH terms*

The screened keywords and/or MeSH terms, including their descriptors, respective strings, and search strategy per each screened database are presented in Table 2.

Broad keywords were intentionally selected to ensure the likely identification of more controlled trials, considering that in a previously published systematic review related to the present topic, only 9 trials on patients' adherence of antibiotics were selected (4). MeSH terms (e.g., "patient compliance" and "patient adherence") and synonyms of keywords were screened and used complementary to the search strategy purposed in the initial protocol (9). A more specific search will be conducted in Google Scholar to refine the displayed findings.

### *Dates of searches and covered timeframe*

Predictably, the first search is predicted to be carried out in August 2023. A final search will be run to update data. All searches will be conducted without time limit.

### *Selection process and data collection*

Selection process and data collection will be carried out, as follows (steps 1 to 4):

First step: after searching the keywords per each database: the title and abstract will be read: (i) papers selected based on title and abstract will be archived, and (ii) the full version of the remaining papers will be consulted before validating their exclusion/inclusion. Motives of exclusion will be annotated.

Second step: all selected papers will be reassessed to validate paper inclusion or exclusion. Motives of exclusion will be annotated.

Third step: extraction of data.

Fourth step: repetition of steps 1 to 3.

### *Data management and collected variables*

Data will be collected by the study author in a Tabular format. All data will be double-checked. PDFs of all searches will be archived. The planned extracted variables are described in the item 12 of the PRISMA-P tool ([Annex A](#)).

### *Bases pesquisadas, palavras-chave e termos MeSH*

As palavras-chave e/ou termos MeSH pesquisados, incluindo os seus descritores, respetivas sequências e estratégia de pesquisa por cada uma das bases pesquisadas está disponível na Tabela 2.

Palavras-chave abrangentes foram intencionalmente selecionadas para garantir a identificação provável de mais ensaios controlados, considerando que numa revisão sistemática previamente publicada e relacionada com o presente tópico, apenas 9 estudos sobre a adesão dos doentes a antibióticos foram selecionados (4). Adicionalmente à estratégia de busca proposta no protocolo inicial (9), foram pesquisados termos MeSH (e.g., "compliance do doente" e "adesão do doente") e sinónimos de palavras-chave. Uma pesquisa mais específica será realizada no Google Académico para aumentar a sensibilidade da pesquisa.

### *Datas das pesquisas e limites de tempo abrangidos*

Previsivelmente, a primeira pesquisa será realizada em agosto de 2023. Uma pesquisa final será efetuada para atualizar os dados. Todas as pesquisas serão conduzidas sem limites de tempo.

### *Processo de seleção e recolha de dados*

O processo de seleção e a recolha de dados será realizado de acordo com os passos 1 de 4:

Primeiro passo: após a pesquisa das palavras-chave por cada base de dados: o título e o resumo serão lidos: (i) os artigos selecionados com base no título e no resumo serão arquivados e (ii) a versão completa dos restantes artigos será consultada antes de validar a sua exclusão/inclusão. Os motivos de exclusão serão anotados.

Segunda passo: todos os artigos selecionados serão reavaliados para validar a sua inclusão ou exclusão. Os motivos de exclusão serão anotados.

Terceira passo: extração dos dados.

Quarto passo: repetição dos passos 1 a 3.

### *Gestão de dados e variáveis recolhidas*

Os dados serão recolhidos pelo autor do estudo em formato tabular. Todos os dados serão duplamente verificados. PDFs de todas as pesquisas serão arquivados. As variáveis cuja recolha está planeada estão descritas no item 12 da ferramenta PRISMA-P ([Anexo A](#)).

**Table 2** - Search strategy for each database**Tabela 2** - Estratégia de pesquisa por cada uma das bases

Database, activated fields, and Link / Bases, campos ativados e Link	Strings of Keywords and/or MesH terms / Sequências de palavras-chave e/ou termos MesH
<b>PubMed*</b> (all fields) / (todos os campos) <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/</a>	(antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and (adherence or compliance) and pharmacy / (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e (adesão ou aceitação) e farmácia  (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "patient adherence" and pharmacy / (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "adesão do doente" e farmácia  (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "patient compliance" and pharmacy / (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "aceitação do doente" e farmácia  (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and (adherence or compliance) and pharmacist / (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e (adesão ou aceitação) e farmacêutico  (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "patient adherence" and pharmacist / (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "adesão do doente" e farmacêutico  (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "patient compliance" and pharmacist / (antibiótico ou antimicrobiano ou antibacteriano ou anti-bacteriano) e "aceitação do doente" e farmacêutico
<b>Cochrane Library</b> (Title, abstract, keyword) / (Título, resumo, palavras-chave) <a href="https://www.cochranelibrary.com/advanced-search">https://www.cochranelibrary.com/advanced-search</a>	The same strings of keywords and/or MesH terms of PubMed / As mesmas sequências de palavras-chave e/ou termos MesH da PubMed
<b>SciELO</b> (all fields) / (todos os campos) <a href="https://www.scielo.org/">https://www.scielo.org/</a>	The same strings of keywords and/or MesH terms of PubMed / As mesmas sequências de palavras-chave e/ou termos MesH da PubMed
<b>Google Scholar** / Google Académico**</b> (all fields) / (todos os campos) <a href="https://scholar.google.com/">https://scholar.google.com/</a>	"patient adherence" and (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "community pharmacy" and pharmacist and trial / "adesão do doente" e (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "farmácia comunitária" e farmacêutico e ensaio  "patient adherence" and (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "hospital pharmacy" and pharmacist and trial / "adesão do doente" e (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "farmácia hospitalar" e farmacêutico e ensaio  "patient compliance" and (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "community pharmacy" and pharmacist and trial / "aceitação do doente" e (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "farmácia comunitária" e farmacêutico e ensaio  "patient compliance" and (antibiotic or antimicrobial or anti-bacterial or antibacterial) and "hospital pharmacy" and pharmacist and trial / "adesão do doente" e (antibiótico ou antimicrobiano ou anti-bacteriano ou antibacteriano) e "farmácia hospitalar" e farmacêutico e ensaio

\* Automatic activated options in PubMed: randomized controlled trial and clinical trial; \*\* A more specific research (with more keywords) will be carried out in Google Scholar, as a consequence of the elevated displayed number of results with the keywords "antibiotic and adherence and pharmacy" (more than 93000 results on 29-4-2023). / \* Na PubMed serão ativadas as seguintes opções automáticas: ensaio clínico randomizado e ensaio clínico; \*\* Uma pesquisa mais específica (com mais palavras-chave) será realizada no Google Académico, como consequência do elevado número de resultados obtidos com as palavras-chave "antibiótico e adesão e farmácia" (mais de 93000 resultados em 29-4-2023).

### *Data synthesis*

A meta-analysis will be carried out (if applicable), although a quantitative synthesis is not expected to be possible. In order to conduct a meta-analysis, the selected studies need to be sufficiently homogeneous in terms of design and comparators (6). However, some measures of effect for the main and secondary outcomes will be collected, such as quantitative data/findings: descriptive statistics (e.g., proportions, percentages, etc. from control vs. intervention groups) as well as data from inferential statistic (if available). Study findings will be discussed and compared through a narrative synthesis. The narrative synthesis will be based on all collected variables (see data items in point 12 of PRISMA-P) ([Annex A](#)). A summary of all selected studies will be prepared in a tabular format.

### *Quality assessment of the selected studies*

Two tools will be applied to evaluate the quality of the selected studies, as follows: (i) The National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) quality assessment tool for Quality Assessment of Controlled Intervention Studies (10) and the (ii) The LEGEND Appraisal Form for randomized controlled trials (RCT) and controlled clinical trial (CCT) (11). Both tools support the identification of eventual methodological limitations, which is in line with the requisites of item 17 of PRISMA-P ([Annex A](#)).

### *Risk of bias, meta-bias(es) and confidence in cumulative evidence*

The adopted methodologies for assessing eventual bias, meta-bias(es) and confidence in cumulative evidence can be respectively consulted in items 14, 16 and 17 of PRISMA-P ([Annex A](#)). Particularly, the risk of bias will respectively be evaluated with the ROBINS-I tool (12) for non-randomized trials and Rob2 for randomized trials (13).

It is important to note that GRADE-CERQual (for qualitative studies) (14) was adopted for evaluating the confidence in cumulative evidence rather than GRADE (for quantitative studies), because diverse limitations in the application of GRADE (15,16) were previously anticipated.

### *Síntese de dados*

Uma meta-análise será realizada (se aplicável), ainda que a concretização de uma síntese quantitativa não seja expectável. Para realizar uma meta-análise, os estudos selecionados precisam ser suficientemente homogêneos em termos de delineamento e comparadores (6). Ainda que, algumas medidas de efeito para os outcomes/desfechos primários e secundários serão recolhidas: estatísticas descritivas (por exemplo, proporções, percentagens, etc. dos grupos de controlo versus intervenção), bem como dados de estatística inferencial (se disponíveis). Os resultados serão discutidos e comparados por meio de uma síntese narrativa. A síntese narrativa será baseada em todas as variáveis recolhidas (ver itens de dados no ponto 12 do PRISMA-P) ([Anexo A](#)). Um sumário em formato tabular de todos os estudos selecionados será elaborado.

### *Avaliação da qualidade dos estudos selecionados*

Duas ferramentas serão aplicadas para avaliar a qualidade dos estudos selecionados: (i) Ferramenta de avaliação de qualidade do Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (NHLBI) para Avaliação da Qualidade de Estudos de Intervenção Controlada (10) e (ii) O Formulário de Avaliação LEGEND para ensaios clínicos randomizados (RCT) e ensaios clínicos controlados (CCT) (11). Ambas as ferramentas suportam a identificação de eventuais limitações metodológicas, o que está em linha com o item 17 do PRISMA-P ([Anexo A](#)).

### *Risco de viés, meta-viés e confiança em evidências cumulativas*

As metodologias adotadas para avaliar eventuais vieses, meta-vieses ou para avaliar a confiança em evidências cumulativas podem ser consultadas respetivamente nos itens 14, 16 e 17 do PRISMA-P ([Anexo A](#)). Particularmente, o risco de viés será respetivamente avaliado com as ferramentas ROBINS-I (12) for para ensaios não controlados e Rob2 para ensaios randomizados (13).

Ressalva-se que o GRADE-CERQual (para estudos qualitativos) (14) foi adotado na avaliação da confiança em evidências cumulativas em vez do GRADE (para estudos quantitativos), porque diversas limitações na aplicação do GRADE (15,16) foram previamente antecipados.



## Results and Discussion

The results of the present systematic review are expected to be published until the end of 2023 or first trimester of 2024. Findings will be discussed and compared through a narrative synthesis, although some descriptive statistics can be applied to quantify some variables (e.g., proportion of female/male participants; % of participants per education degree, average, and standard deviation of the number of participants, etc.). Additionally, a high risk of bias of the selected studies is anticipated, since the selected controlled trials were designed to evaluate pharmacist communication-based interventions (i.e., studies from social sciences, necessarily associated with a certain degree of methodological heterogeneity and subjectivity).

Overall, an impact (positive or negative) of pharmacist communication-based interventions on patient adherence to antibiotics in community or hospital pharmacies is expected in this systematic review, because the findings of previous similar/related studies are not consensual (with some studies detecting negative (4,17) or positive (18) results)).

Only one systematic review related to the present topic has been identified, which was conducted by Lambert et al. (2022) (4). It should be noted that from the 17 selected studies in this systematic review, patient adherence to antibiotics was reported in only 12 out of these 17 studies as a secondary outcome, with only 9 studies complying with the inclusion criteria of the present systematic review. These 9 studies will be included in the present work (if not identified by the proposed search methodology). The findings from this systematic review were somewhat unexpected, i.e., the "adherence to antibiotics did not significantly increase after pharmacist-led interventions" (4), although this conclusion was based on a restricted number of studies. For instance, differences in patient adherence to antibiotics were also not found between the intervention and control groups in the trial of Göktay (2013) (17), in opposition to the findings of Gotsch (1982), with increased adherence in the intervention group (18). Both controlled trials were based on a pharmacist communication-based intervention (17,18).

## Resultados e Discussão

Espera-se que os resultados da presente revisão sistemática sejam publicados até o final de 2023 ou no primeiro trimestre de 2024. Os resultados serão discutidos e comparados por meio de uma síntese narrativa, embora algumas estatísticas descritivas possam ser aplicadas para quantificar algumas variáveis (por exemplo, proporção de participantes do sexo feminino/masculino; % de participantes por nível de ensino, média e desvio padrão do número de participantes, etc.). Adicionalmente, antecipa-se um risco de viés elevado nos estudos selecionados, uma vez que os ensaios controlados selecionados foram desenhados para avaliar intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação (ou seja, estudos de ciências sociais, necessariamente associados a um certo grau de heterogeneidade e subjetividade metodológica).

Globalmente, espera-se detectar um impacto (positivo ou negativo) das intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação na adesão dos doentes aos antibióticos em farmácias comunitárias ou hospitalares com a presente revisão sistemática, porque os resultados de estudos anteriores similares/relacionados não são consensuais (com alguns estudos a detectarem resultados negativos (4,17) ou positivos (18)).

Apenas uma revisão sistemática relacionada com o presente tópico foi identificada, a qual foi efetuada Lambert et al. (2022) (4). De enfatizar que dos 17 estudos selecionados nesta revisão sistemática, a adesão do doente a antibiótico foi apenas reportada como desfecho secundário em 12 desses 17 estudos, com apenas 9 estudos cumprindo os critérios de inclusão da presente revisão sistemática. Esses 9 estudos serão incluídos no presente trabalho (caso não sejam identificados pela metodologia de pesquisa proposta). Os resultados desta revisão sistemática em certa medida foram considerados inesperados, i.e., a "adesão aos antibióticos não aumentou significativamente após as intervenções lideradas pelo farmacêutico" (4), embora esta conclusão tenha sido baseada num número restrito de estudos. Por exemplo, diferenças de adesão do doente aos antibióticos também não foram identificadas entre os grupos de intervenção e controle no estudo de Göktay (2013) (17), em oposição aos resultados de Gotsch (1982), com uma maior adesão aos antibióticos no grupo de intervenção (18). Uma intervenção farmacêutica baseada na educação foi utilizada em ambos os estudos controlados (17,18).

## **Study Limitations**

Data collection and analysis will be carried by just one author, which could lead to eventual selection and/or analysis biases. However, all results will be double-checked. For instance, two tools will be applied to assess the quality of the selected articles (10,11). The number of selected databases and keywords may have been limited, although the use of Google Scholar and the selection of studies without time limitations will predictably enhance the capture of more results.

## **Conclusion**

In this work, a preliminary protocol of a systematic review on the impact of controlled pharmacist communication-based interventions on patient adherence to antibiotics is presented.

## **Author contributions statement**

This protocol was entirely conceived, designed and written by CP. In addition, this protocol has been peer-reviewed by experts in the field and has been updated according to their suggestions and corrections.

## **Funding**

None.

## **Acknowledgements**

The author expresses her thanks to CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal.

## **Conflict of Interests**

The author declares that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest

## **Limitações do estudo**

A recolha e análise dos dados será realizada por apenas um autor, o que pode levar a eventuais vieses de seleção e/ou análise, ainda que esteja previsto fazer uma dupla conferência de todos os resultados. Por exemplo, aplicação de duas ferramentas na avaliação da qualidade dos artigos selecionados (10,11). O número de bases de dados e palavras-chave selecionados pode ser limitado. No entanto, a utilização do Google Académico e a seleção de estudos sem limitações temporais previsivelmente permite potenciar a captação de mais resultados.

## **Conclusão**

Neste trabalho é apresentado preliminarmente um protocolo de uma revisão sistemática sobre o impacto das intervenções farmacêuticas baseadas em comunicação na adesão do doente aos antibióticos, em estudos controlados.

## **Declaração sobre as contribuições do autor**

Este protocolo foi totalmente concebido, desenhado e escrito por CP. Adicionalmente, o presente protocolo foi revisto por pares, por especialistas desta área, tendo sido atualizado em conformidade com as sugestões e correções dos mesmos.

## **Financiamento**

Nenhum.

## **Agradecimentos**

A autora expressa os seus agradecimentos a CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal.

## **Conflito de Interesses**

A autora declara que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

- To identify the most effective pharmacist communication-based interventions, which improve patients' antibiotic adherence (secondary objective).

#### Primary and secondary research questions

- What is the impact of pharmacist communication-based interventions on patients' adherence to antibiotics? (primary research question)
- What were the types of pharmacist communication-based to improve antibiotic adherence? (secondary research question)
- What were the most effective pharmacist communication-based interventions to improve antibiotic adherence? (secondary research question)

## Materials and Methods

The present protocol was developed according to PRISMA-P (5,6). PRISMA-P checklist applied to the present protocol can be consulted in [Annex A](#).

### *Type of review and registration protocol*

The present systematic review will be conducted according to the Joanna Briggs Institute (JBI) guidance and reported according to PRISMA checklist and flow diagram (7,8). The detailed protocol of the present systematic review is registered in OSF Registries (The open registries network) (9).

### *PICO*

The Population, Intervention, Comparison, and Outcome (PICO) framework is presented in Table 1. PICO was applied to support the formulation of objectives, research questions as well as the literature review (5,6).

### *Intervention*

Intervention: any pharmacist communication-based intervention provided to patients aiming at specifically improving the antibiotic adherence (e.g., patient counselling/education, interviews, workshops, provision of written information, or other).

- Identificar as intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação mais eficazes na melhoria da adesão dos doentes aos antibióticos (objetivo secundário).

#### Questões de investigação primárias e secundárias

- Qual é o impacto das intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação na adesão dos doentes aos antibióticos? (questão de investigação principal)
- Quais foram os tipos de intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação para melhorar a adesão aos antibióticos? (questão de investigação secundária)
- Quais foram as intervenções farmacêuticas baseadas na comunicação mais eficazes para melhorar a adesão aos antibióticos? (questão de investigação secundária)

## Materiais e Métodos

O presente protocolo foi desenvolvido de acordo com o PRISMA-P (5,6). A lista de verificação PRISMA-P aplicada ao presente protocolo pode ser consultada no [Anexo A](#).

### *Tipo de revisão e registo do protocolo*

A presente revisão sistemática será respetivamente conduzida de acordo com as normas do Joanna Briggs Institute (JBI) e reportada de acordo com a lista de verificação e o diagrama de fluxo PRISMA (7,8). O protocolo detalhado da presente revisão sistemática já está registado no OSF Registries (The open registries network) (9).

### *PICO*

A População, Intervenção, Comparação e Resultado (PICO) são apresentadas na Tabela 1. Esta informação foi utilizada para apoiar na formulação dos objetivos, nas questões de investigação, bem como na revisão da literatura (5,6).

### *Intervenção*

Intervenção: qualquer intervenção farmacêutica baseada em comunicação com o objetivo específico de melhorar a adesão aos antibióticos dos doentes (por exemplo, aconselhamento/educação do doente, entrevistas, workshops, fornecimento de informações por escrito, ou outras).

## References / Referências

1. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health (OIE). (2021). Antimicrobial resistance and the United Nations Sustainable Development Cooperation Framework: guidance for United Nations country teams. ISBN (WHO) 978-92-4-003602-4 (electronic version).
2. Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
3. European Commission. (2017). EU Guidelines for the prudent use of antimicrobials in human health (2017/C 212/01). Available at: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0701\(01\)&from=ET](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0701(01)&from=ET) (accessed on 4-5-2023).
4. Lambert, M., Smit, C. C. H., De Vos, S., Benko, R., Llor, C., Paget, W. J., Briant, K., Pont, L., Van Dijk, L., & Taxis, K. (2022). A systematic literature review and meta-analysis of community pharmacist-led interventions to optimise the use of antibiotics. *British journal of clinical pharmacology*, 88(6), 2617–2641. <https://doi.org/10.1111/bcp.15254>
5. Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., Stewart, L. A., & PRISMA-P Group (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic reviews*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>
6. Shamseer, L., Moher, D., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., Stewart, L. A., & PRISMA-P Group (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ (Clinical research ed.)*, 350, g7647. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7647>
7. Aromataris, E., & Munn, Z. (Editors). JBI Manual for Evidence Synthesis. JBI, 2020. Available at: <https://synthesismanual.jbi.global>. <https://doi.org/10.46658/JBIMES-20-01>
8. PRISMA. (2023). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist and flow diagram. Available at: <http://prisma-statement.org/prismastatement/flowdiagram.aspx> (acedido em 13-5-2023).
9. Pires, C. (2023). Impact of controlled pharmaceutical communication-based interventions on patient adherence to antibiotics: a systematic review, May 2023. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/D7FEU>
10. NHLBI. (2021). The National Heart, Lung, and Blood institute (NHLBI) quality assessment tool for Quality Assessment of Controlled Intervention Studies. Available at: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools> (accessed on 13-5-2023).
11. Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence Evaluation Tools & Resources (LEGEND). Available at: <https://www.cincinnatichildrens.org/research/divisions/janderson-center/evidence-based-care/legend> (acedido em 13-5-2023).
12. Sterne, J.A.C., Hernán, M.A., McAleenan, A., Reeves, B.C., & Higgins, J.P.T. Chapter 25: Assessing risk of bias in a non-randomized study. In: Higgins, J.P.T., Thomas, J., Chandler, J., Cumpston, M., Li, T., Page, M.J., & Welch, V.A. (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3* (updated February 2022). Cochrane, 2022. Available at: [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook).
13. Higgins, J.P.T., Savović, J., Page, M.J., Elbers, R.G., & Sterne, J.A.C. Chapter 8: Assessing risk of bias in a randomized trial. In: Higgins, J.P.T., Thomas, J., Chandler, J., Cumpston, M., Li, T., Page, M.J., & Welch, V.A. (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3* (updated February 2022). Cochrane, 2022. Available at: [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook).
14. Lewin, S., Booth, A., Glenton, C., Munthe-Kaas, H., Rashidian, A., Wainwright, M., Bohren, M. A., Tunçalp, Ö., Colvin, C. J., Garside, R., Carlsen, B., Langlois, E. V., & Noyes, J. (2018). Applying GRADE-CERQual to qualitative evidence synthesis findings: introduction to the series. *Implementation science : IS*, 13(Suppl 1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13012-017-0688-3>
15. Berkman, N.D., Lohr, K.N., Ansari, M., et al. Grading the Strength of a Body of Evidence When Assessing Health Care Interventions for the Effective Health Care Program of the Agency for Healthcare Research and Quality: An Update. 2013 Nov 18. In: *Methods Guide for Effectiveness and Comparative Effectiveness Reviews* [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174881/>
16. Granholm, A., Alhazzani, W., & Möller, M. H. (2019). Use of the GRADE approach in systematic reviews and guidelines. *British journal of anaesthesia*, 123(5), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.08.015>.
17. Göktay, N.B., Telefoncu, S., Kadioğlu, S.B., et al. (2013). The role of patient education in adherence to antibiotic therapy in primary care. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17, 113-119.
18. Gotsch, A.R.A., & Liguori, S. (1982). Knowledge, attitude, and compliance dimensions of antibiotic therapy with PPIs: a community pharmacy-based study. *Medical care*, 20(6), 581–595. <https://doi.org/10.1097/00005650-198206000-00004>

### Annex A

PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic review and Meta-Analysis Protocols) 2015 checklist (5,6):  
recommended items to address in a systematic review protocol

Section and topic	Item No	Checklist item
<b>ADMINISTRATIVE INFORMATION</b>		
Title:		
Identification	1a	The reference to a protocol of a systematic review is clearly identified in the Title and Materials and Methods.
Update	1b	This protocol is not an update of a previous systematic review.
Registration	2	Yes: <a href="https://osf.io/d7feu">https://osf.io/d7feu</a>
Authors:		
Contact	3a	Carla Pires (CP), CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal, <a href="mailto:p5558@ulusofona.pt">p5558@ulusofona.pt</a>
Contributions	3b	CP developed, wrote and revised the present paper/protocol. Subsequently, this protocol was peer-reviewed by two experts. All corrections and suggestions proposed by the two reviewers were accepted and implemented.
Amendments	4	The JBI (5), ROBINS-I (12), Rob2 [(13), and GRADE-CERQual (14) tools will be complementarily applied. Exclusive selection of trials involving community or hospital pharmacists providing communication-based intervention to improve patient's antibiotic adherence, i.e., interventions of technicians or researchers to improve patient's antibiotic adherence under the direct supervision of a community or hospital pharmacist will not be selected, with the aim of improving the methodological homogeneity between trials. The initial proposed strings of keywords/MeSH terms ( <a href="https://osf.io/d7feu">https://osf.io/d7feu</a> ) were updated to improve the precision of searches. The first search will be run in August 2023 (instead of April 2023).
Support:		
Sources	5a	No financial sources or other support.
Sponsor	5b	No sponsor.
Role of sponsor or funder	5c	Not applicable.
<b>INTRODUCTION</b>		
Rationale	6	The rationale for the review was described in the context of what is already known (see Introduction).
Objectives	7	Objectives and review questions are available at the end of Introduction.
<b>METHODS</b>		
Eligibility criteria	8	Eligibility criteria and PICO are defined in the section of Material and Methods (see Inclusion and exclusion criteria).
Information sources	9	The databases as well as the planned dates for searches are presented in material and Methods (see the subsections Databases, Dates of searches and covered timeframe).
Search strategy	10	The search strategy per database is presented in Table 2 (see Materials and Methods).
Study records:		
Data management	11a	The mechanisms that will be used to manage records and data throughout the review are presented in Materials and Methods (see Data management).
Selection process	11b	The selection process will be carried out by the author of the systematic review. The selection process is described in Materials and Methods (see Data collection and selection process).
Data collection process	11c	The data collection process will be carried out the author of the systematic review. The data collection process is described in Materials and Methods (see Data collection and selection process).

*continued next page*

Annex A, continued

Section and topic	Item No	Checklist item
Data items	12	Extracted variables (when available/reported): title, author(s), year, country, study objective, study design, detailed/exhaustive description of the pharmaceutical communication-based intervention, measurement method, administered antibiotic (dosage and duration of treatment), setting (community or hospital pharmacy), number of patients (control vs. intervention group), patients demographics (at least age, sex, and education, if described), primary and secondary outcome(s) (data/findings from descriptive or inferential statistic will also be collected, if reported) and main conclusion.
Outcomes and prioritization	13	Primary outcome: Impact on antibiotic adherence (control vs. intervention group). Secondary outcomes: <ul style="list-style-type: none"> <li>· Patient satisfaction with antibiotic adherence;</li> <li>· Patient perception about antibiotic adherence;</li> <li>· Patient knowledge about antibiotic adherence;</li> <li>· Patient comprehension about antibiotic adherence.</li> </ul>
Risk of bias in individual studies	14	The risk of bias will be checked with the tool ROBINS-I tool (12) for non-randomized trials and Rob2 for randomized trials (13). Considering that the selected controlled trials will be from the social sciences domain (i.e., communication-based interventions), a higher risk of bias and, eventually, a higher number of non-randomized trials are expected.
Data synthesis	15a	The measures of effect for the main and secondary outcomes will be collected based on quantitative data/findings: descriptive statistics (e.g., proportions, percentages, etc. from control vs. intervention groups) as well as data from inferential statistic (if available).
	15b	A meta-analysis will be carried out (if applicable), although a quantitative synthesis is not expected to be possible.
	15c	A meta-analysis will be carried out (if applicable). For instance, subgroup analyses can be used to evaluate the robustness of meta-analyses (6).
	15d	All findings will be discussed and compared through a narrative synthesis (for more details see data synthesis in Material and methods).
Meta-bias(es)	16	The following issues will be evaluated: registration (or not) of each trial: ClinicalTrials.gov ( <a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/manage-recs/how-register">https://clinicaltrials.gov/ct2/manage-recs/how-register</a> ) and Home/International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) ( <a href="https://trialsearch.who.int/Default.aspx">https://trialsearch.who.int/Default.aspx</a> ), previous publication (or not) of a protocol, and auto-reported bias (or not) in each trial.
Confidence in cumulative evidence	17	The GRADE-CERQual ('Confidence in the Evidence from Reviews of Qualitative research') will be applied. This "approach provides guidance for assessing how much confidence to place in findings from systematic reviews of qualitative research or qualitative evidence syntheses" (14).

**Anexo A**

PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic review and Meta-Analysis Protocols) 2015 checklist (5,6):  
itens recomendados para abordar num protocolo de revisão sistemática

<b>Secções e tópicos</b>	<b>Item No</b>	<b>Item da checklist</b>
<b>INFORMAÇÕES ADMINISTRATIVAS</b>		
Título:		
Identificação	1a	A referência a um protocolo de revisão sistemática está claramente identificada no Título e materiais e métodos.
Atualizações	1b	Este protocolo não é uma atualização de uma revisão sistemática anterior.
Registro	2	Sim: <a href="https://osf.io/d7feu">https://osf.io/d7feu</a>
Autores:		
Contacto	3a	Carla Pires (CP), CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, <a href="mailto:p5558@ulusofona.pt">p5558@ulusofona.pt</a>
Contribuições	3b	CP desenvolveu, redigiu e fez a revisão do presente artigo/protocolo. Posteriormente, o presente protocolo foi revisto por pares por dois especialistas. Todas as correções e sugestões propostas pelos dois revisores foram aceites e implementadas.
Emendas	4	As ferramentas JBI (5), ROBINS-I (12), Rob2 (13) e GRADE-CERQual (14) serão complementarmente aplicadas. Seleção exclusiva de ensaios envolvendo farmacêuticos comunitários ou hospitalares, cujas intervenções se baseiam na comunicação para melhorar a adesão dos doentes aos antibióticos, i.e., intervenções de técnicos ou investigadores sob a supervisão direta do farmacêutico comunitário/hospitalar não serão selecionados, com o objetivo de melhorar a homogeneidade metodológica entre os ensaios. As palavras-chave/termos MeSH inicialmente propostos ( <a href="https://osf.io/d7feu">https://osf.io/d7feu</a> ) foram atualizados, para melhorar a precisão da pesquisa. A primeira pesquisa será realizada em agosto de 2023 (em vez de abril de 2023).
Suporte:		
Fontes	5a	Sem fontes de financiamento ou outros apoios.
Patrocinadores	5b	Nenhum patrocinador.
Papel do patrocinador ou financiador	5c	Não aplicável.
<b>INTRODUÇÃO</b>		
Racional	6	O racional para a concretização da revisão foi descrito no contexto do que já é conhecido (ver Introdução).
Objetivos	7	Os objetivos e as perguntas de investigação estão disponíveis no final da Introdução.
<b>MÉTODOS</b>		
Critérios de eleição	8	Os critérios de elegibilidade e os itens PICO estão definidos na secção dos Materiais e Métodos (ver Critérios de inclusão e exclusão).
Fontes de informação	9	As bases de dados, bem como as datas de pesquisa previstas estão apresentadas nos Materiais e Métodos (ver as subsecções sobre as Bases de dados, Datas de pesquisas e período abrangido).
Estratégia de pesquisa	10	A estratégia de pesquisa por base de dados é apresentada na Tabela 2 (ver Materiais e Métodos).
Registros de estudo:		
Gestão de dados	11a	Os mecanismos utilizados na gestão dos registos e dos dados ao longo da revisão estão apresentados nos Materiais e Métodos (ver Gestão de dados).
Processo de seleção	11b	O processo de seleção será efetuado pela autora da revisão sistemática. O processo de seleção é descrito nos Materiais e Métodos (ver Recolha de dados e processo de seleção).
Processo de recolha de dados	11c	O processo de recolha de dados será realizado pela autora da revisão sistemática. O processo de recolha de dados está descrito nos Materiais e Métodos (ver Recolha de dados e processo de seleção).

*continua na próxima página*

Anexo A, continuação

Secções e tópicos	Item No	Item da checklist
Itens/dados	12	Variáveis extraídas (se disponíveis/reportadas): título, autor(es), ano, país, objetivo do estudo, desenho do estudo, descrição detalhada/exaustiva da intervenção baseada em comunicação farmacêutica, método de medição do desfecho, antibiótico administrado (dosagem e duração do tratamento), local (farmácia comunitária ou hospitalar), número de doentes (grupo de controle vs. intervenção), dados demográficos dos doentes (pelo menos idade, sexo e educação, se descritos), desfecho(s)/outcome(s) principal e secundários (dados de estatística descritiva ou inferencial também serão recolhidos, se reportados) e principais conclusões.
Desfechos/outcomes e priorização	13	Outcome/desfecho principal: Impacto na adesão aos antibióticos (controle vs. grupo de intervenção).  Desfechos/outcomes secundários: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Satisfação do doente com a adesão aos antibióticos;</li> <li>• Perceção do doente sobre adesão aos antibióticos;</li> <li>• Conhecimento do doente sobre adesão aos antibióticos;</li> <li>• Compreensão do doente sobre a adesão aos antibióticos.</li> </ul>
Risco de viés em estudos individuais	14	O risco de viés será verificado com a ferramenta ROBINS-I (13) para ensaios não randomizados e Rob2 para ensaios randomizados (13). Considerando que os ensaios controlados selecionados serão do domínio das ciências sociais (ou seja, intervenções baseadas na comunicação), são esperados/antecipados vieses e, eventualmente, um número superior de ensaios não randomizados.
Síntese de dados	15a	As medidas de efeito para os desfechos/outcomes primários e secundários serão recolhidas, com base em dados quantitativos: estatísticas descritivas (por exemplo, proporções, percentagens, etc. dos grupos de controlo versus intervenção), bem como dados de estatística inferencial (se disponíveis).
	15b	Uma meta-análise será realizada (se aplicável), embora não se espere que uma síntese quantitativa seja possível.
	15c	Uma meta-análise será realizada (se aplicável). Por exemplo, as análises de subgrupos podem ser usadas para avaliar a robustez das meta-análises (6).
	15d	Todos os resultados serão discutidos e comparados por meio de uma síntese narrativa (para mais detalhes ver a síntese de dados nos materiais e métodos).
Meta-viés	16	Serão avaliadas os seguintes aspetos: registro (ou não) de cada ensaio: ClinicalTrials.gov ( <a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/manage-recs/how-register">https://clinicaltrials.gov/ct2/manage-recs/how-register</a> ) e Home/International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) ( <a href="https://trialsearch.who.int/Default.aspx">https://trialsearch.who.int/Default.aspx</a> ), publicação prévia (ou não) do protocolo e viés auto-reportado (ou não) em cada ensaio.
Confiança nas evidências cumulativas	17	A ferramenta GRADE-CERQual ('Confidence in the Evidence from Reviews of Qualitative research') será aplicada. Esta "abordagem fornece orientação para avaliar a confiança, que se deve colocar nos resultados de revisões sistemáticas de pesquisas qualitativas ou sínteses de evidências qualitativas" (14).



## Celiac disease in children (Clinical case)

## Doença celíaca na criança (Caso clínico)

Bruno Sousa<sup>1,2,3</sup>   & José Luís Nunes<sup>3</sup>

**Keywords:** Celiac disease, children, gluten-free diet

**Palavras-chave:** Doença celíaca, criança, dieta isenta de glúten

### To Cite:

Sousa, B. & Nunes J. L. (2023) Celiac disease in children (Clinical case). *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 150-155.

 [10.19277/bbr.20.1.309](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.309)

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

2 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

3 - Health Service of Autonomous Region of Madeira

Correspondence to / Correspondência a:  
[bruno.sousa@ulusofona.pt](mailto:bruno.sousa@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 19/05/2023  
Accepted / Aceite: 11/06/2023

### Introduction

11-year-old female child. Sent to the Nutrition Consultation due to suspicion of celiac disease and to start a gluten-free diet, after analytical values with positive IgA anti-gliadin and IgA anti-transglutaminase antibodies and associated symptoms: asthenia, anorexia, abdominal pain, abdominal distension and diarrhea.

Subsequently, for further analytical research and to perform an upper digestive endoscopy with biopsy, a gluten diet was reintroduced.

The child is followed in pedopsychiatry for attention deficit hyperactivity disorder and challenging personality.

### Introdução

Criança de 11 anos, do sexo feminino. Enviada à Consulta de Nutrição por suspeita de Doença Celíaca e para iniciar dieta isenta de glúten, após valores analíticos com anticorpos anti-gliadina IgA e anti-transglutaminase IgA positivos e com sintomatologia associada: astenia, anorexia, dor abdominal, distensão abdominal e diarreia.

Após dieta isenta de glúten melhorou significativamente na sintomatologia. Posteriormente, para nova pesquisa analítica e realização de endoscopia digestiva alta com biópsia, foi reintroduzida uma dieta com glúten.

A criança é seguida na pedopsiquiatria por perturbação de hiperatividade e défice de atenção e personalidade desafiadora.

## Anthropometric evaluation

Weight: 39.3 kg  
Height: 152 cm  
BMI: 17 kg/m<sup>2</sup>

### Body composition assessment (TANITA TBF 300®)

Body fat: 15.4%  
Fat mass: 6.1 kg  
Fat-free mass: 33.2 kg  
Total body water: 24.3 kg

## Analytical parameters

### Hematology

Leukocytes: 4.9 10<sup>3</sup>/μL (4.0 – 10.0)  
Erythrocytes: 4.21 10<sup>6</sup>/μL (3.80 – 5.70)  
Hemoglobin: 11.8 g/dL (11.9 – 16.9)  
Hematocrit: 35.1% (34.0 – 47.0)  
Mean corpuscular volume: 83.4 fL (77.0 – 91.0)  
Mean corpuscular hemoglobin: 28.0 pg (>27.2)  
Platelets: 379 10<sup>3</sup>/μL (144 – 440)

### Biochemistry

Glucose: 91 mg/dL (60.0 – 100.0)  
Urea: 20 mg/dL (8.0 – 50.0)  
Creatinine: 0.38 mg/dL (0.58 – 0.79)  
Sodium: 140.0 mEq/L (136 – 145)  
Potassium: 4.0 mEq/L (3.5 – 5.10)  
Chlorine: 105.0 mEq/L (98–107)  
Alanine Aminotransferase: 24.5 U/L (<=33.0)  
Aspartate Aminotransferase: 25.0 U/L (<=32)  
Gamma-glutamyltransferase: 13.2 U/L (5.0 – 36.0)

### Hematinic factors

Ferritin: 33.0 ng/mL (13–150)  
Folic Acid: 3.95 ng/mL (>3.89)  
Vitamin B12: 532 pg/mL (197 – 771)

### Immunology

IgA (serum): 69.7 mg/dL (45.0 – 250)

Ac. Anti-Gliadin, IgG: 62.1 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Gliadin, IgA: 72.7 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Transglutaminase, IgG: 0.0 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Transglutaminase, IgA: >200 U/mL (Positivo: >10)

## Avaliação antropométrica

Peso: 39,3 kg  
Estatura: 152 cm  
IMC: 17kg/m<sup>2</sup>

### Avaliação da composição corporal (TANITA TBF 300®)

Gordura corporal: 15,4%  
Massa gorda: 6,1 kg  
Massa isenta de gordura: 33,2kg g  
Água corporal total: 24,3 kg

## Parâmetros analíticos

### Hematologia

Leucócitos: 4,9 10<sup>3</sup>/μL (4 – 10,0)  
Eritrócitos: 4,21 10<sup>6</sup>/μL (3,80 – 5,70)  
Hemoglobina: 11,8 g/dL (11,9 – 16,9)  
Hematócrito: 35,1% (34,0 – 47,0)  
Volume corpuscular médio: 83,4 fL (77,0 – 91,0)  
Hemoglobina corpuscular média: 28,0 pg (>27,2)  
Plaquetas: 379 10<sup>3</sup>/μL (144 – 440)

### Bioquímica

Glicose: 91 mg/dL (60,0 – 100,0)  
Ureia: 20 mg/dL (8,0 – 50,0)  
Creatinina: 0,38 mg/dL (0,58 – 0,79)  
Sódio: 140,0 mEq/L (136 – 145)  
Potássio: 4,0 mEq/L (3,5 – 5,10)  
Cloro: 105,0 mEq/L (98 – 107)  
Alanina Aminotransferase: 24,5 U/L (<=33,0)  
Aspartato Aminotransferase: 25,0 U/L (<=32)  
Gamma-glutamiltransferase: 13,2 U/L (5,0 – 36,0)

### Factores Hematínicos

Ferritina: 33,0 ng/mL (13–150)  
Ácido Fólico: 3,95 ng/mL (>3,89)  
Vitamina B12: 532 pg/mL (197 – 771)

### Imunologia

IgA (soro): 69,7 mg/dL (45,0 – 250)

Ac. Anti-Gliadina, IgG: 62,1 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Gliadina, IgA: 76,7 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Transglutaminase, IgG: 0,0 U/mL (Positivo: >10)  
Ac. Anti-Transglutaminase, IgA: >200 U/mL (Positivo: >10)

### *Complementary diagnostic exams*

Upper Digestive Endoscopy:  
Duodenum and bulb with "cobblestone" appearance.  
Performed biopsies.

Anatomopathological report:  
Morphological aspects suggestive of Celiac Disease, to be evaluated in the clinical context. If there are clinical and analytical criteria for Celiac Disease, then the aspects observed in the biopsy correspond to grade 3 of the modified Marsh classification (Marsh-Oberhuber).

### **Clinical evaluation**

#### *Personal background*

- Attention deficit hyperactivity disorder

#### *Medication*

- Methylphenidate  
- Risperidone  
- Melatonin

#### *Intestinal transit*

Regular (after gluten-free diet)

### **Eating habits**

Wake up at 6:45 am

Breakfast: 7 am  
Gluten-free bread (50 g) with boiled egg or oat pancakes with banana  
1 natural or aroma yoghurt

Morning snack: 10 am  
Gluten-free bread (50 g) with 1 slice of cheese  
1 medium piece of fruit

Lunch: 1 pm  
Dish: Half a plate of white rice or gluten-free pasta + meat or fish (120 g) + vegetables (about 100 g)  
Water to drink

### *Exames complementares de diagnóstico*

Endoscopia Digestiva Alta:  
Duodeno e bulbo com aspecto "empedrado".  
Realizadas biopsias.

Relatório anatomopatológico:  
Aspectos morfológicos sugestivos de Doença Celiaca, a valorizar no contexto clínico. Se houver critérios clínicos e analíticos de Doença Celiaca então os aspectos observados deste produto de biopsia correspondem ao grau 3 da Classificação de Marsh modificada (Marsh-Oberhuber).

### **Avaliação clínica**

#### *Antecedentes pessoais*

Perturbação de hiperatividade e défice de atenção

#### *Medicação*

- Metilfenidato  
- Risperidona  
- Melatonina

#### *Trânsito intestinal*

Regular (após dieta isenta de glúten)

### **Hábitos alimentares**

Acorda às 6h45

Pequeno-almoço: 7h  
Pão (50 g) sem glúten com ovo cozido ou pancakes de aveia com banana  
1 iogurte natural ou aroma

Lanche da manhã: 10h  
Pão (50 g) sem glúten com 1 fatia de queijo  
1 peça de fruta média

Almoço: 13h  
Prato: Meio prato de arroz branco ou massa sem glúten + carne ou peixe (120 g) + vegetais (cerca de 100 g)  
Bebe água

Afternoon snack: 4 pm  
1 flavoured liquid yoghurt  
Gluten-free bread (50 g) with 1 slice of cheese

Dinner: 8:30 pm  
Dish: Half a plate of white rice or gluten-free pasta + meat or fish (120 g) + vegetables (about 100 g)  
Dessert: 1 medium piece of fruit  
Water to drink

Supper: 9 pm  
1 medium piece of fruit

Going to bed at 9:45 pm  
Water consumption: about 1.5 L per day

### **Environment, behaviour and social**

The child lives with her mother and older sister. Parents separated.

She eats most of her meals at home and has a healthy diet routine. However, she does like fast food and particularly pizza.

She is active, not only at school and particularly in physical education, and practices judo twice a week.

### **Author Contributions Statement**

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

### **Acknowledgements**

The authors wish to express their thanks to the child and the caregiver who allowed the elaboration of the case study.

### **Conflict of Interests**

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

Lanche da tarde: 16h  
1 iogurte líquido de aroma  
Pão (50 g) sem glúten com 1 fatia de queijo

Jantar: 20h30  
Prato: Meio prato de arroz branco ou massa sem glúten + carne ou peixe (120 g) + vegetais (cerca de 100 g)  
Sobremesa: 1 peça de fruta média  
Bebe água

Ceia: 21h30  
1 peça de fruta média

Deita-se às 21h45

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

### **Ambiente, comportamento e social**

A criança vive com a mãe e a irmã mais velha. Pais separados.

Realiza a maioria das suas refeições em casa e tem por rotina uma alimentação saudável. Contudo gosta muito de fast food e particularmente de pizza.

É ativa, não só na escola e particularmente na educação física, e pratica judo, duas vezes por semana.

### **Contribuição dos Autores**

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

### **Agradecimento**

Os autores desejam expressar o seu agradecimentos à criança e ao encarregado de educação que permitiram a elaboração do estudo de caso.

### **Conflito de interesses**

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

## Questions

1. Is it possible to make a secure diagnosis of celiac disease in children without a biopsy?
2. After diagnosis, should adherence to a gluten-free diet be assessed?
3. Is it recommended to detect immunogenic gluten peptides when assessing adherence to a gluten-free diet?
4. In the follow-up of a child with celiac disease, what care should be taken in growth assessment?
5. Is it necessary to implement a lactose-free diet for a child with celiac disease?

## Questões

1. É possível fazer um diagnóstico seguro de Doença Celíaca na criança sem necessidade de biópsia?
2. Após o diagnóstico, a adesão à dieta isenta de glúten deve ser avaliada?
3. É recomendável a deteção dos péptidos imunogénicos do glúten na avaliação da adesão à dieta sem glúten?
4. No acompanhamento de uma criança com doença celíaca que cuidados devem ser tidos em consideração na avaliação do crescimento?
5. Na criança com doença celíaca é necessário implementar uma dieta sem lactose?

1. Sim. Com valores de anticorpo anti-transglutaminase IgA elevado, igual ou 10 vezes o limite superior do normal, com testes precisos e aprorriados de anticorpo anti-endomísio IgA positivo numa segunda amostra de soro.

2. Sim. Não existe um método-padrão, mas deve ser avaliada multidimensionalmente através de inquéritos alimentares, de uma avaliação dos sintomas, e de testes laboratoriais.

3. Atualmente ainda não existe a recomendação para a determinação de péptidos imunogénicos do glúten nas fezes/urina como forma de avaliação da adesão à dieta isenta de glúten na prática clínica, sendo necessários mais dados para fundamentar esta recomendação.

4. Caso não seja atingido um crescimento significativo na estatura da criança no prazo de um ano após o início da dieta isenta de glúten, quando existe adesão a esta dieta, é recomendada a realização de investigações adicionais para excluir outras causas de baixa estatura.

5. Não. Se, com a adesão a uma dieta isenta de glúten, existirem sintomas sugestivos de intolerância à lactose, como diarreia contínua ou dor abdominal, é então recomendado um teste com uma alimentação com redução de lactose. Contudo, inicialmente, sobretudo em formas graves de doença, pode coexistir intolerância à lactose que é temporária (por atrofia das vilosidades e redução da lactase), e que nestes casos os alimentos com lactose devem ser consumidos de forma moderada.

1. Yes, with elevated IgA anti-transglutaminase antibody testing positive on a second serum sample.

2. Yes, there is no standard method, but it should be assessed multidimensionally through dietary surveys, symptom assessment, and laboratory tests.

3. Currently, there is no recommendation for the determination of immunogenic gluten peptides in stool/urine as a way to assess adherence to the gluten-free diet in clinical practice, and more data are needed to support this recommendation.

4. If significant growth in the child's stature is not achieved within one year of starting the gluten-free diet, when adherence to this diet is present, further investigations are recommended to exclude other causes of short stature.

5. No. If, with adherence to a gluten-free diet, there are symptoms suggestive of lactose intolerance, such as continuous diarrhoea or abdominal pain, then a test with a reduced-lactose diet is recommended. However, initially, especially in severe forms of the disease, temporary lactose intolerance may coexist (due to villus atrophy and reduction of lactase), and in these cases foods containing lactose should be consumed in moderation.

## References / Referências

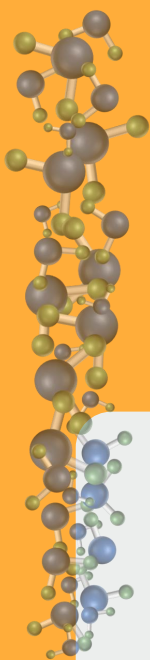
Czaja-Bulsa, G., & Bulsa, M. (2018). Adherence to Gluten-Free Diet in Children with Celiac Disease. *Nutrients*, *10*(10), 1424. <https://doi.org/10.3390/nu10101424>

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., Werkstetter, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *70*(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>

Mearin, M. L., Agardh, D., Antunes, H., Al-Toma, A., Auricchio, R., Castillejo, G., Catassi, C., Ciacci, C., Discepolo, V., Dolinsek, J., Donat, E., Gillett, P., Guandalini, S., Husby Md DMSc, S., Koletzko Md, S., Koltai, T., Korponay-Szabó, I. R., Kurppa, K., Lionetti, E., Mårild, K., ... ESPGHAN Special Interest Group on Celiac Disease (2022). ESPGHAN Position Paper on Management and Follow-up of Children and Adolescents With Celiac Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *75*(3), 369–386. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003540>

Moya, D. A., Nugent, C. A., Baker, R. D., & Baker, S. S. (2020). Celiac Disease Nutritional Status and Poor Adherence to Follow-up. *Clinical pediatrics*, *59*(7), 649–655. <https://doi.org/10.1177/0009922820912216>

Wessels, M., Dolinsek, J., Castillejo, G., Donat, E., Riznik, P., Roca, M., Valitutti, F., Veenvliet, A., & Mearin, M. L. (2022). Follow-up practices for children and adolescents with celiac disease: results of an international survey. *European journal of pediatrics*, *181*(3), 1213–1220. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04318-2>



# BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO  
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

## Contents / Conteúdos

- 1 **2023 - On the same path to a new future (Editorial)**  
*2023 - No mesmo caminho para um novo futuro (Editorial)*  
L. Monteiro Rodrigues
- 3 **Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography**  
*Comparação das alterações de perfusão após hiperémia reactiva no membro superior avaliadas por Fluxometria de Laser Doppler e por Tomografia Fotoacústica*  
Sérgio Faloni de Andrade, Tiago Granja & Luís Monteiro Rodrigues
- 13 **Evaluation of the Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) inhibitory activity of pimaranes and their glycosyl derivatives**  
*Avaliação da atividade inibitória da proteína tipo Lisil oxidase 2 (LOXL2) de pimaranos e seus derivados glicosídicos*  
Sandra Ferreira, Patrícia Riço, João G. Costa, Nuno Saraiva, Beatriz Santos, Clara Uriel, Ana Maria Gómez, A. M. Díaz-Lanza, & Ana S. Fernandes
- 25 **Food Labeling - Knowledge among university students in the Lisbon region: an exploratory study**  
*Rotulagem alimentar - Conhecimento de estudantes universitários, um estudo exploratório*  
Leandro Oliveira, Catarina Manoel, Márcia Ribeiro, Diogo Pedro, Catarina Simões Rodrigues, & Carina Rossoni
- 37 **Relationship between weight status with sleep health, physical activity and perception of food consumption under stress among firefighters: a pilot study**  
*Relação entre o estado ponderal com a saúde do sono, atividade física e percepção do consumo sob stress entre os bombeiros: um estudo piloto*  
Leandro Oliveira, Carolina Oliveira, Madalena Martins, Madalena Silva, Sofia Martins & Carina Rossoni
- 51 **Social networks and food choice of adolescents from a school in the Lisbon region**  
*As redes sociais e a escolha alimentar de adolescentes de uma escola da região de Lisboa*  
Ana Carina Almeida & Bruno Sousa
- 64 **Methanol extract of Bauhinia forficata leaves reduced serum creatinine level and prevented the elevation of hepatic enzymes in mice exposed to gentamicin and acetaminophen: an exploratory study**  
*O extrato metanólico das folhas de Bauhinia forficata reduziu o nível de creatinina sérica e impediu a elevação das enzimas hepáticas em ratinho expostos a gentamicina e acetaminofeno: um estudo exploratório*  
Sebastián Funes-Rivera, María L. Kennedy, Antonia K. Galeano, Patricia M. Funes Torres & Miguel A. Campuzano-Bublitz
- 83 **Food and Nutrition Knowledge of Elementary School Teachers in a Region of Lisbon, Portugal**  
*Conhecimento em Alimentação e Nutrição de Professores do Ensino Básico numa uma Região de Lisboa, Portugal*  
Andreia Pedro, Cíntia Ferreira-Pêgo, Carina Rossoni & Emília Alves
- 93 **Addressing the digital divide: who is being left behind in the evaluation of e-Health interventions to improve medication adherence?**  
*Abordando a iniquidade digital: quem está a ser deixado para trás na avaliação das intervenções de e-Health para melhorar a adesão aos medicamentos?*  
João Gregório, Tiago Maricoto, Paulo A.S. Moreira, Fátima Roque, Jaime Correia-de-Sousa, Maria Teresa Herdeiro, Isabel F Almeida, Ioanna Tsiligiani Tamas Agh & Cristina Jácome
- 106 **Methods for cutaneous penetration assessment of organic UV filters - a review**  
*Métodos para avaliação da penetração cutânea de filtros solares orgânicos – uma revisão*  
Débora Quintas Balla, Alicia Vitorino de Souza Neto, Renata Miliani Martinez, Alexandra de Almeida Hübner, Catarina Rosado, André Rolim Baby & Fabiana Vieira Lima
- 126 **A review of the study of environmental modeling tools to understand the real impact of cosmetic products on environmental safety**  
*Revisão do estudo de ferramentas de modelagem ambiental para entender o real impacto dos produtos cosméticos na segurança ambiental*  
Caroline Inácio Bianchi & Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
- 136 **Impact of controlled pharmacist communication-based interventions on patient adherence to antibiotics: a protocol of a systematic review**  
*Impacto de intervenções farmacêuticas controladas na adesão do doente aos antibióticos: protocolo de uma revisão sistemática*  
Carla Pires
- 150 **Celiac disease in children (Clinical case)**  
*Doença celíaca na criança (Caso clínico)*  
Bruno Sousa & José Luís Nunes

Supplement | Suplemento

CBC

Book of Abstracts: 34th Brazilian Congress of Cosmetology  
*Livro de Resumos: 34º Congresso Brasileiro de Cosmetologia*