

Biomed Biopharm Res  
18 (1) 1 - S154 (2021)

print  
ISSN 2182-2360

online  
ISSN 2182-2379

# BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO  
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Editor | Luís Monteiro Rodrigues

Sponsored by / Com o patrocínio da



**CPLP**  
Comunidade dos Países  
de Língua Portuguesa

Vol. 18, No. 1

# Biomedical and Biopharmaceutical Research

Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica



Associação Lusófona para o Desenvolvimento da Ensino e Investigação em Ciência da Saúde

*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

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

## Editor in chief / Editor Coordenador

Luis Monteiro Rodrigues

## Emeritus Editor in chief / Editor Coordenador Emeriti

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

## Executive Editors / Editores Executivos

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

## Consulting Editors / Editores Consultores

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

directoriales@alies.pt  
bbr\_office@alies.pt

## Electronic Edition / Edição eletrônica

<https://www.alies.pt/en/archive.html>  
<https://www.alies.pt/pt/archivo.html>

## Distribution / Distribuição

ALIES

Dep. Legal: 33195511

ISSN Print: 2182-2360

ISSN Online: 2182-2379

## Communication Manager / Gerente de Comunicação

Patricia M. Rijo

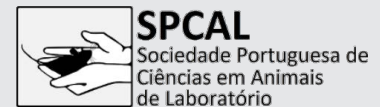
## Production Manager / Gerente de Produção

Amanda B. Rodrigues

## Website Manager / Gerente de Website

Clemente Rocha

Scientific Partners | *Parceiros Científicos*





Luís Monteiro Rodrigues

Editor

## BBR 18.1

### This issue in brief - a renewed vision

The alteration of our normal paths in the last two years created countless challenges around the world, and yet time marched on. As Editor-in-Chief, I am proud that BBR continued forward, thanks to the combined effort of our authors, our reviewers, and our editors. We continued to work to improve our organizational, technical, and scientific quality, and have taken the opportunity to remind ourselves of our vision and prioritise our objectives. From the beginning, our goal with this unique project has been to foster societal progress through knowledge with impact on (individual as in community) health within the Portuguese speaking countries around the world. Still, we recognize that the world is small, and that positive impact with our lusophone universe can positively impact the world at large, and the converse is also true. Our steps forward for this number include operation improvements in our submission and review processes, and important evolutions in our editorial policies, including diversity, equity, and equality, and in our scope, with more and more focus in core issues around the founding domains of Biomedical and Biopharmaceutical Sciences. Our commitment to excellence finds a clear expression in these examples, and we intend to continue to actively consolidate our future in this direction.

BBR is now exclusively structured in these two domains. The **Biomedical Sciences** section begins with an original cross-sectional study on the the “Impact of the year of graduation on the positioning of nutrition professionals regarding the vegetarian diet “ a recognised trend that still does not gather an unanimous recognition among nutrition professionals (*Biomed Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 4-14; 10.19277/bbr.18.1.248).

The next manuscript is an original exploratory paper comparing the vegetarian-vegan and omnivore body composition of young women. In recent years, vegetarian-vegan diets have gained many followers, though systematic reviews regarding the purported advantages over traditional diets are lacking. An interesting set of results involving the adipose component, in particular, justifies the need for larger study samplings, currently ongoing (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 15-24; 10.19277/bbr.18.1.258).

Another research paper investigating the inhibitory activity of methanolic fruit extracts from several south America species on  $\alpha$ -amylase and intestinal  $\alpha$ -glucosidase (maltose and sucrose) follows. A potential application of some of these nutrients in the control of glycemia is envisaged (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 25-37; 10.19277/bbr.18.1.259).

### Este numero em breves notas - uma visão renovada

A alteração do “normal” nos últimos dois anos criou inúmeros desafios em todo o mundo, e no entanto o tempo continuou a avançar. Como editor-chefe deste jornal, estou orgulhoso por termos continuado a avançar, graças ao esforço combinado dos nossos autores, dos nossos revisores e dos nossos editores. Continuámos a trabalhar para melhorar a nossa qualidade organizacional, técnica, e científica, e aproveitámos a oportunidade para nos lembrarmos da nossa visão e priorizar os nossos propósitos. Desde o início, o nosso objectivo principal deste projecto único tem sido fomentar o progresso das sociedades nos países de língua portuguesa em todo o mundo através do conhecimento com impacto na saúde (individual como na comunidade). Ainda assim, reconhecemos que o mundo é pequeno, e que o impacto positivo no nosso universo lusófono pode afectar positivamente o mundo em geral, sendo que o inverso também é verdadeiro. Os nossos progressos neste número incluem melhorias operacionais nos processos de submissão e revisão, e importantes evoluções nas nossas políticas editoriais, incluindo diversidade, equidade e igualdade. No nosso âmbito, focamos cada vez mais questões centrais em torno dos domínios fundadores das Ciências Biomédicas e Biofarmacêuticas. O nosso compromisso com a excelência encontra uma expressão clara nestes exemplos, e pretendemos continuar a consolidar activamente o nosso futuro nesta direcção.

A BBR está agora exclusivamente estruturada nestes dois domínios. A secção de **Ciências Biomédicas** começa com um estudo transversal original sobre o "Impacto do ano de licenciatura no posicionamento dos profissionais de nutrição relativamente à dieta vegetariana", uma tendência reconhecida que ainda não foi conseguiu reunir opiniões unânimes entre os profissionais de nutrição (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 4-14; 10.19277/bbr.18.1.248).

O manuscrito que se segue reúne um estudo exploratório original comparando a composição corporal de mulheres jovens vegetarianas-vegan e omnívoras. Nos últimos anos a dieta vegetariana-vegan têm ganho muitos seguidores, independentemente da falta de revisões sistemáticas sobre as alegadas vantagens destas face às dietas tradicionais. Um conjunto interessante de resultados envolvendo em particular o tecido adiposo justifica a necessidade de maiores amostragens de estudo, atualmente em curso (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 15-24; 10.19277/bbr.18.1.258).

Segue-se um outro trabalho de investigação que incide sobre a actividade inibitória dos extractos de vários frutos metanólicos de espécies da América do Sul sobre a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glucosidase intestinal (maltose e sacarose) tendo em mente uma potencial aplicação de alguns destes nutrientes no controlo da glicemia (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 25-37; 10.19277/bbr.18.1.259).

The next original paper approaches the *in vivo* effects of skin topically applied methylnicotinate (MN), one of the most popular challengers used in experimental dermatology. Some questions regarding MN mechanisms remain unanswered, but the results seem to reinforce the good safety profile of this product for human *in vivo* studies (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 38-47; 10.19277/bbr.18.1.257).

The section continues with a review on brain metastases from patients with HER2+ metastatic breast cancer, a growing concern in oncology. This review updates current systemic treatment options for these patients and presents a case study in a Portuguese population (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 48-61; 10.19277/bbr.18.1.253).

Closing this section, the Clinical Case category includes an interesting analysis report regarding "herpetiform dermatitis" (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 62-67; 10.19277/bbr.18.1.250).

The **Biopharmaceutical Sciences** section begins with a research paper on new procedures in community pharmacy practice involving medication review of patients' electronic records to identify by criteria-based algorithms, patient clusters. This practice will progress to be fully automated, providing tailored pharmacy services (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 68-82; 10.19277/bbr.18.1.251).

The next research paper addresses the acceptability of a kefir drink investigated for its impact on cutaneous health. This dairy product has been referred as especially beneficial to various human health conditions (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 83-91; 10.19277/bbr.18.1.252).

Another original paper focuses on the use of industrial waste as a resource for modern sustainable industry and environmental preservation. This paper shows results from the sensory analysis of grape pomace flour cookies addressing a current issue for many researchers today (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 92-102; 10.19277/bbr.18.1.249).

Continuing this section is an interesting paper concerning the enrichment of French bread with chromium, a strategy associated with improved glycemic control, and confirms that it is possible to produce this chromium enriched - yeast with no compromise of the production technology or the bread's physical characteristics (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 103-113; 10.19277/bbr.18.1.255).

In sequence, another research paper on natural products, a major regular theme in our editions. The *Plectranthus* species, a well-known medicinal species with recognised pharmacology, is revisited regarding cytotoxic activities. Results from Royleanone derivatives on brine shrimp (*Artemia salina*) are here analysed and discussed also in the perspective of the toxicity screening model here applied (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 114-122; 10.19277/bbr.18.1.254).

O artigo original que se segue aborda os efeitos *in vivo* do metilnicotinato (MN) aplicado topicamente na pele um dos químicos mais populares utilizados em dermatologia experimental. Algumas questões relativas aos mecanismos do MN permanecem sem resposta, mas os resultados parecem reforçar o bom perfil de segurança deste produto para estudos humanos *in vivo* (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 38-47; 10.19277/bbr.18.1.257).

Esta secção continua com uma revisão sobre metástases cerebrais de doentes com cancro da mama metastático HER2+ uma preocupação crescente em oncologia. Esta revisão actualiza as principais opções de tratamento sistémico para estes pacientes e apresenta um estudo de caso numa população portuguesa (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 48-61; 10.19277/bbr.18.1.253).

Encerrando esta secção o Caso Clínico inclui um interessante relatório de análise relativo à "dermatite herpetiforme" (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 62-67; 10.19277/bbr.18.1.250).

A secção de **Ciências Biofarmacêuticas** começa com um trabalho de investigação sobre novos procedimentos na prática farmacêutica comunitária envolvendo a revisão de registos electrónicos de prescrição dos pacientes identificados por algoritmos baseados em critérios para seleccionar grupos de pacientes. Esta prática progredirá para ser totalmente automatizada, permitindo á farmácia um serviço cada vez mais preciso e personalizado (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 68-82; 10.19277/bbr.18.1.251).

O trabalho de investigação que se segue aborda a aceitabilidade de uma bebida de kefir aqui investigada sobre o seu impacto na saúde cutânea. Este produto lácteo tem sido referido como especialmente benéfico para várias condições de saúde humana (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 83-91; 10.19277/bbr.18.1.252).

Outro trabalho original foca a utilização de recursos e resíduos industriais como um factor chave para a moderna indústria, sustentável e para a preservação ambiental. Este manuscrito mostra os resultados da análise sensorial de bolachas de farinha de bagaço de uva, abordando uma questão atual para muitos investigadores nestes domínios (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 92-102; 10.19277/bbr.18.1.249).

Continuando esta secção, um interessante trabalho explorando as preocupações com o enriquecimento do pão francês com crómio, uma estratégia associada a um melhor controlo glicémico mostrando que é possível produzir este enriquecimento sem comprometer a tecnologia de produção ou as características físicas do pão (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 103-113; 10.19277/bbr.18.1.255).

Em sequência, esta secção edita outro trabalho de investigação sobre produtos naturais, um tema importante e regular nas nossas edições. As espécies de *Plectranthus*, espécies medicinais bem conhecidas com farmacologia reconhecida, são revisitadas em relação à sua citotoxicologia. Os resultados dos derivados de Royleanona sobre o modelo de camarão marinho (*Artemia salina*) são aqui analisados e discutidos também na perspectiva do modelo de rastreio de toxicidade aqui aplicado (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 114-122; 10.19277/bbr.18.1.254).

Closing this section is a paper centred in a current concern from R&D in assuring, as part of the sustainability chain, the safety of new ingredients including compounds used for actives extraction. In this case, the focus is the extraction of collagen, a key ingredient within the cosmetic industry, studying cytotoxic and genotoxic effects of certain solutions used in the extraction process (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 123-138, 10.19277/bbr.18.1.256).

Finally, this issue also includes one additional Supplement only available in this online version – the Abstract Book of the Fascination of Plants Day, an important meeting supported by our journal (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): S139-S155, 10.19277/bbr.18.1.260). Held in Lisboa in May at the Universidade Lusofona, the theme this year was “Get to know herbal medicines better.”

O último trabalho de investigação aqui apresentado reflecte uma preocupação actual da I&D em assegurar, como parte da cadeia de sustentabilidade, a segurança de novos ingredientes, incluindo compostos utilizados para a extracção de activos. Neste caso, o foco é a extracção de colagénio, um ingrediente principal da indústria cosmética, estudando os efeitos citotóxicos e genotóxicos das soluções utilizadas no processo (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): 123-138; 10.19277/bbr.18.1.256).

Finalmente, este número também inclui um suplemento adicional disponível apenas nesta versão online - o Livro de Resumos do Dia da Fascinação das Plantas, uma importante reunião apoiada pela nossa revista (*Biomed & Biopharm Res.*, 2021; 18(1): S139-S155; 10.19277/bbr.18.1.260). Realizado em Lisboa em Maio na U Lusofona, o tema deste ano foi “Vem conhecer melhor os Medicamentos à base de plantas.”

**L Monteiro Rodrigues**

*Editor*

## Impact of the year of graduation on the positioning of nutrition professionals regarding the vegetarian diet

*Impacto do ano de formação no posicionamento dos profissionais de nutrição face à dieta vegetariana*

Aline Ambrósio<sup>1</sup>, Leticia Vasconcelos<sup>1</sup>, Marta Raposo<sup>1</sup>, Cíntia Ferreira-Pêgo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Lusófona, School of Sciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

\*corresponding author: cintia.pegno@ulusofona.pt

---

### Abstract

The adoption of a vegetarian diet increased over the years. In Portugal, it is estimated that 1.2% of the population follows this food pattern. A cross-sectional study was carried out, including a final sample of 74 nutrition professionals to assess their position concerning the vegetarian diet (VD) according to their year of graduation (YG). The results analyses demonstrated that 23 nutrition professionals graduated between 1980 and 2009; and 51 between 2010 and 2019. There were statistically significant differences regarding the possibility of keeping a VD throughout life, since 81.1% of the participants consider it possible, most of them belonging to the group who graduated after 2009. As for supplements, 13% of the nutrition professionals who graduated until 2009 believe it possible to adhere to a VD without resorting to supplements, however, the percentage increases significantly to 39.2% in nutrition professionals trained after 2009. The percentage of nutrition professionals that approved the adherence of athletes to VD increased statistically in recent years, however, most believe this adherence is only possible with the use of supplements. Adherence to VD has increased over the past few years, however, the opinion of nutrition professionals is not unanimous regarding its safety, effectiveness in weight loss, and use of supplementation.

**Keywords:** Vegetarian Diet; Nutritionists; Scientific Evidence; Year of graduation; Nutrition Professionals

---

### Resumo

A adoção de um padrão alimentar vegetariano tem aumentado ao longo dos anos. Em Portugal estima-se que 1.2% da população siga este padrão alimentar. Realizou-se um estudo transversal que incluiu uma amostra de 74 profissionais de nutrição com o objetivo de avaliar a posição dos mesmos face à dieta vegetariana (DV) em função do seu ano de formação (AF). 23 profissionais de nutrição formaram-se entre os anos de 1980 e 2009; e 51 entre os anos de 2010 e 2019. Observaram-se diferenças significativas quanto à possibilidade de manter uma DV ao longo da vida, onde 81.1% dos inquiridos consideram ser possível, sendo que a maioria pertencente ao grupo formado após 2009. Quanto à suplementação, 13% dos profissionais de nutrição formados até 2009 acreditam ser possível aderir à DV sem recorrer à suplementação, no entanto, a percentagem aumenta significativamente para 39.2% nos profissionais de nutrição formados após 2009. A percentagem de profissionais de nutrição que aprova a adesão de atletas à DV aumentou estatisticamente nos últimos anos, contudo, a maioria acredita que esta adesão apenas é possível mediante o uso de suplementos. A adesão à DV tem aumentado ao longo dos últimos anos, contudo a opinião dos profissionais de nutrição não é unânime quanto à sua segurança, eficácia e suplementação.

**Palavras-chave:** Dieta Vegetariana; Nutricionistas; Evidência Científica; Ano de formação; Profissionais de nutrição

## Introduction

The vegetarian food pattern, more commonly referred to as “vegetarian food” or “vegetarian diet (VD),” is known and has been practiced for several centuries for economic, religious, ethical, environmental, or health reasons (1). Pythagoras is considered the founder of the vegetarian movement, and the people of ancient Greece were also great supporters (1). Religions such as Buddhism, Jainism, and Hinduism also played an important role in promoting the vegetarian diet (1). In the 19<sup>th</sup> century, with the development of societies, health care units, the publication of books, and the opening of restaurants, the vegetarian movement began its expansion (2). The adoption of a vegetarian dietary pattern has been increasing over the years in Europe, not only among the adult population but also among children and adolescents (3). According to a study published by Meat Atlas in 2014, it is estimated that 2 to 10% of European people are vegetarian (4). In September 2007, Nielsen Media Research conducted a study for the *Portuguese Vegetarian Center*, being the first to analyze a representative sample of the Portuguese population to determine the number of vegetarians in Portugal. Ten years later, in September 2017, the study was repeated, and the conclusion shows a very surprising evolution. The number of vegetarians has quadrupled in 10 years, with 1.2% of Portuguese not currently consuming meat or fish. In 2007, only 0.3% of the Portuguese population followed this lifestyle and diet (5).

The VD includes a wide range of eating practices, heterogeneous in composition, and with varying restrictions (6). The many types of vegetarian diets share the same characteristic - the exclusion of meat and fish - while some also suppress eggs, milk, and dairy products. This diet is based on foods of plant origin, such as cereals, legumes, roots, oilseeds, fruits, vegetables, nuts, among others (6). According to the *Academy of Nutrition and Dietetics*, the VD is defined as one that does not include meat (including poultry) or seafood or products that contain these same foods (7,8). According to some studies, meat is a good source of energy and several essential nutrients, such as protein and micronutrients, namely iron, zinc, and vitamin B12 (9). However, epidemiological studies show that high consumption of red and specially processed meat is a risk factor for several chronic diseases, such as colorectal cancer (10), Type 2 Diabetes Mellitus (DM) (11), and cardiovascular diseases (12). Vegetarians, in general, consume less caloric food, since their diet contains a lower total amount of fat and proteins of

## Introdução

O padrão alimentar vegetariano, mais designado por “alimentação vegetariana” ou “dieta vegetariana (DV)” é conhecido e tem sido praticado desde há vários séculos por razões económicas, religiosas, éticas, ambientais ou de saúde (1). Pitágoras é considerado o fundador do movimento vegetariano e o povo da Grécia antiga, um grande apoiante (1). Religiões como o Budismo, Jainismo e Hinduísmo também tiveram um papel importante na promoção da DV (1). No século XIX, com a formação das sociedades, unidades de cuidados de saúde, publicação de livros e abertura de restaurantes, o movimento vegetariano iniciou a sua expansão (2). A adoção de um padrão alimentar vegetariano tem vindo a aumentar ao longo dos anos na Europa, não só entre a população adulta, mas também entre crianças e adolescentes (3). Segundo um estudo publicado pela Meat Atlas em 2014, estima-se que 2 a 10% dos europeus sejam vegetarianos (4). Em setembro de 2007, a Nielsen Media Research realizou um estudo para o Centro Vegetariano Português, sendo este o primeiro que utilizou uma amostra representativa da população portuguesa, com o intuito de determinar o número de vegetarianos em Portugal. Passados dez anos, em setembro de 2017, repetiu-se o estudo e as conclusões mostram uma evolução muito surpreendente. O número de vegetarianos quadruplicou em 10 anos, com 1.2% dos portugueses a não consumirem carne nem peixe, atualmente. Em 2007, apenas 0.3% da população portuguesa seguia este estilo de vida e de alimentação (5).

A DV constitui uma vasta gama de práticas alimentares, heterogêneas na sua composição e com restrições variáveis (6). Os muitos tipos de DV compartilham a mesma característica: a eliminação de carne e peixe enquanto alguns também eliminam ovos, leite e produtos lácteos. Esta dieta é baseada em alimentos de origem vegetal, como cereais, leguminosas, raízes, oleaginosas, frutas, legumes, frutos secos, entre outros (6). De acordo com a Academia de Nutrição e Dietética, a DV é definida como aquela que não inclui carne (incluindo aves) ou frutos do mar ou produtos que contenham esses mesmos alimentos (7,8).

A carne é, segundo alguns estudos, uma boa fonte de energia e de vários nutrientes essenciais, como a proteína e micronutrientes, nomeadamente ferro, zinco e vitamina B12 (9). No entanto, estudos epidemiológicos mostram que um alto consumo de carne vermelha e especialmente processada é um fator de risco para várias doenças crónicas, como cancro



animal origin (13). The main concern of nutrition professionals in adhering to the vegetarian diet has been the measurement of protein intake, especially regarding essential amino acids (13), as well as some micronutrients such as vitamin B12, vitamin D, and iron (14).

Due to all of these reasons, but mainly due to the lack of consensus on the part of health professionals regarding the benefits and/ or risks of the vegetarian diet, the main objective of this study was to assess the opinion of nutrition professionals, with professional activity in Portugal, concerning the vegetarian diet, its benefits, and risks.

## Materials and Methods

### *Design and study population*

An observational cross-sectional study was conducted between April and May 2020, which included a sample of 74 nutrition professionals. All participants were practicing their profession in Portugal at the time of data collection. There were no other exclusion criteria than the non-practice of the profession, which indicates that subjects of all ages, genders, academic degrees, areas of professional activity, career time, and those who studied at public, private, or foreign universities were included. Nutrition professionals were recruited with the support of professional associations specific to this type of individual. The questionnaire was shared through their platforms, and emails were also sent to all members. All participants were informed about the objectives and purposes of the study prior to data collection, were informed of the anonymity of their data, and gave their signed informed consent.

### *Vegetarian Diet*

Data collection was performed using an online non-validated questionnaire. This questionnaire was specifically developed by the researchers for these data collection and consisted of 26 questions. Two questions were regarding sociodemographic characteristics (age and gender), 5 regarding professional graduation (place of graduation, academic degree, area of professional activity, time of activity, and frequency with which they attend nutrition symposia and congresses), and the

colorretal (10), Diabetes Mellitus (DM) Tipo 2 (11) e doenças cardiovasculares (12). Os vegetarianos, geralmente, consomem menor quantidade calórica alimentar, devido ao facto da sua dieta ser composta por menor quantidade total de gordura e proteínas de origem animal (13). A preocupação principal dos profissionais de nutrição, na adesão à DV, tem sido a aferição em relação à ingestão proteica, especialmente no que diz respeito aos aminoácidos essenciais (13), bem como alguns micronutrientes como vitamina B12, vitamina D, e ferro (14).

Devido a todos estes motivos, mas sobretudo devido à falta de consenso por parte dos profissionais de saúde quanto aos benefícios e/ ou riscos da DV, o principal objetivo do presente estudo foi conhecer a opinião de Nutricionistas e Dietistas, com atuação profissional em Portugal, em relação à dieta vegetariana, seus benefícios e riscos.

## Material e Métodos

### *Desenho e estudo da População*

Foi realizado um estudo observacional de carácter transversal, entre Abril e Maio de 2020, que incluiu uma amostra de 74 nutricionistas e dietistas. Todos os participantes deveriam exercer a sua profissão em território Português no momento da recolha dos dados. Não existiram critérios de exclusão, além da não exercício da profissão, o que indica que foram incluídos sujeitos de todas as idades, géneros, graus académicos, áreas de atuação profissional, tempo de carreira e obtenção do grau em universidades públicas, privadas ou estrangeiras. Os profissionais de nutrição foram recrutados mediante o auxílio de associações profissionalizantes específicas para este tipo de indivíduos. Foi partilhado o questionário através das suas plataformas e também foi enviado emails a todos os associados. Os inquiridos foram, antecipadamente da recolha dos dados, esclarecidos sobre os objetivos e finalidades do estudo, assim como da anonimidade dos seus dados, tendo assinado um consentimento informado.

### *Dieta Vegetariana*

A recolha de dados foi realizada mediante um questionário online não-validado. Este questionário foi desenvolvido especificamente pelos investigadores do projeto para esta recolha de dados e foi composto por 26 perguntas: 2 sobre características sociodemográficas

remaining 19 questions were regarding the position of nutrition professionals regarding the VD. These final questions included: whether (or not) it would be healthy, if adherence would be discouraged, if animal products would be indispensable, to what age groups would they recommend this type of diet, if it has long and short benefits, if it would be possible to maintain this diet throughout life, if it would have all the necessary nutrients, if adherence would be possible without the use of supplements and which ones would be most recommended, if the absence of animal products makes this diet healthier, if vegetarians are at higher risk of developing anemia, if this diet is recommended for athletes, if the consumption of dairy products and eggs is recommended, and if the VD is recommended as a weight-loss method. All the questions were multi-choice, and no open answer was also available for each question.

### *Statistical analysis*

The acquired data was entered into the Excel database and transformed into numeric codes to be transferred to the IBM SPSS Statistics software version 26. The distribution of the selected characteristics between the groups was compared using Pearson  $\chi^2$  tests for categorical variables, in which the units were expressed in % (n). All analyses of the nutrition professionals' opinions on the VD were performed according to the participants' year of graduation (YG). To determine this relationship, the YG was divided into two analysis groups: from 1980 to 2009 and from 2010 to 2019. The objective of this analysis was to observe differences between several decades of training and the most recent scientific evidence regarding the VD as the bibliography on the subject has evolved greatly in recent years, and it is important to know the professional updating of nutritionists and dietitians. All statistical tests performed were two-tailed tests and the level of significance was considered to be  $p < 0.05$ .

## **Results**

The sample consisting of 74 participants was characterized based on the YG, in which 23 participants graduated between 1980 and 2009, and 51 between 2010 and 2019. This data was statistically related to gender, year of birth, and time in professional practice (Table 1). No other significant differences were observed regarding the place of training, academic degree, the area of practice, or the frequency that congresses were attended.

(idade e gênero); 5 sobre formação profissional (local de formação, grau acadêmico, área de atuação profissional, tempo de exercício da profissão e frequência com que assistem a convenções e congressos da área); e as restantes 19 questões sobre a posição dos nutricionistas face à DV (se seria saudável, se desaconselharia a adesão, se os produtos de origem animal seriam indispensáveis, a que faixas etárias recomendaria este tipo de alimentação, se tem benefícios a longo e a curto prazo, se seria possível manter esta dieta ao longo da vida, se teria todos os nutrientes necessários, se seria possível a adesão sem o uso de suplementos e quais os que mais recomendam, se a ausência de produtos animais faz com que esta dieta seja mais saudável, se os vegetarianos têm maior risco de desenvolver anemia, se recomenda esta dieta a atletas, se recomenda o consumo de laticínios e ovos e se aconselharia a DV como método de emagrecimento). Todas as questões eram de escolha múltipla, e em nenhuma delas foi permitida resposta aberta.

### *Análise Estatística*

Os dados adquiridos foram introduzidos no software Excel, e transformados em códigos numéricos para serem transferidos para o software IBM SPSS Statistics versão 26. Comparou-se a distribuição das características selecionadas entre os grupos usando testes de Qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas, nas quais, as unidades foram expressas em % (n). Todas as análises sobre a opinião dos profissionais de nutrição sobre a DV, foram realizadas em função do ano de formação (AF) dos participantes. Para realizar esta relação, agruparam-se os AF em dois grupos de análise: entre 1980 a 2009 e entre 2010 a 2019. O objetivo desta análise foi observar diferenças entre várias décadas de formação e as mais recentes evidências científicas respeito à DV, visto que a bibliografia referente ao tema evoluiu bastante nos últimos anos e é importante conhecer a atualização profissional dos nutricionistas e dietistas. Todos os testes estatísticos realizados foram testes bicaudais e o nível de significância foi considerado para  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

A amostra composta por 74 participantes foi caracterizada em base ao AF, no qual 23 inquiridos formaram-se entre 1980 e 2009; e 51 entre 2010 e 2019, tendo sido estes dados estatisticamente relacionados com o sexo, o ano de nascimento e tempo de atuação profissional

(Tabela 1). Não foram observadas outras diferenças significativas em relação ao local de formação, grau acadêmico, área de atuação ou frequência de assistência a congressos.

**Table 1** - General characteristics of the population characterized by year of formation.

**Tabela 1** - Características gerais da população caracterizadas por ano de formação.

	<b>General Population / População Geral (n=74)</b>	<b>1980 to 2009 (n=23)</b>	<b>2010 to 2019 (n=51)</b>	<b>p-value*</b>
<b>Gender / Género</b>				
Women / Mulher	89.2 (66)	78.3 (18)	94.1 (48)	0.042
Men / Homem	10.8 (8)	21.7 (5)	5.9 (3)	
<b>Year of Birth / Ano de Nascimento</b>				
1950 - 1979	21.7 (16)	52.2 (12)	7.9 (4)	<0.001
1980 - 1989	35.1 (26)	47.8 (11)	29.4 (15)	
1990 - 1999	43.2 (32)	0.0 (0)	62.7 (32)	
<b>Place of Training / Local de Formação</b>				
University / Universidade	78.4 (58)	78.3 (18)	78.4 (40)	0.987
Polytechnique / Politécnico	21.6 (16)	21.7 (5)	21.6 (11)	
<b>Academic Degree / Grau Académico</b>				
Degree / Licenciatura	55.4 (41)	60.9 (14)	52.9 (27)	0.691
Post Graduation / Pós-Graduação	21.6 (16)	13.1 (3)	25.5 (13)	
Masters / Mestrado	18.9 (14)	21.7 (5)	17.7 (9)	
Ph.D. / Doutorado	4.1 (3)	4.3 (1)	3.9 (2)	
<b>Area of practice / Área de atuação</b>				
Clinical / Clínica	86.5 (64)	87.0 (20)	86.3 (44)	0.937
Sports / Desportiva	14.9 (11)	8.7 (2)	17.6 (9)	0.316
Mass catering /Restauração coletiva	20.3 (15)	21.7 (5)	19.6 (10)	0.833
Community / Comunitária	18.9 (14)	17.4 (4)	19.6 (10)	0.822
Investigação / Research	4.1 (3)	0.0 (0)	5.9 (3)	0.235
<b>Practice experience / Tempo de atuação</b>				
< 5 years / anos	37.8 (28)	0.0 (0)	54.9 (28)	<0.001
≥ 5 years / anos	62.2 (46)	100.0 (23)	45.1 (23)	
<b>Congresses frequency / Frequência de congressos</b>				
Often / Frequentemente	41.9 (31)	34.8 (8)	45.1 (23)	0.405
Occasionally / Ocasionalmente	58.1 (43)	65.2 (15)	54.9 (28)	

All data are expressed in % (n). \* p-value for comparisons between groups were tested using Pearson  $\chi^2$  tests. /

Todos os dados são expressos em % (n). \* p-value para comparações entre grupos foram testados mediante testes de Pearson  $\chi^2$ .

According to Table 2, it is possible to observe that regardless of YG, most nutrition professionals do not believe that VD is a healthy diet. On the other hand, it was possible to verify that the majority of the nutrition professionals who graduated after 2009 (64.7%) recommend adhering to this type of food pattern, in contrast to the nutrition professionals who graduated until this year, as a majority of these advise against it. Regarding the benefits of the VD in the long and short term, it was determined that the nutrition professionals who graduated in 2009 or earlier do not consider that this diet can be beneficial to health, contradicting the opinion of nutrition professionals who graduated after this date. Regarding products of animal origin, most nutrition professionals agreed that the absence of these does not make the diet healthier; however, there was an increase in the percentage of nutrition professionals who graduated after 2009 who think the opposite. Approximately 52% of the nutrition professionals who graduated in 2009 or earlier and 72.5% graduated after this date indicated that they believed that, if the VD was balanced, all the necessary nutrients would be provided. The results also show that the majority of nutrition professionals consider that there is a greater risk of developing anemia in the presence of a VD, however, it was observed that there was a decrease in this thought in nutrition professionals who graduated after 2009. Regarding following this type of eating pattern as a weight-loss method, in both groups, most nutrition professionals agreed that it was not a good strategy for this purpose. It is important to note that none of these described relationships was statistically significant.

Nevertheless, statistically significant differences were found regarding the possibility of keeping a VD throughout life, where 81.1% of the studied population considered it possible, with the majority of these being in the group graduating after 2009. Concerning supplementation, only 13% of the nutrition professionals who graduated up until 2009 believed that it was possible to adhere to the VD without any type of supplement consumption, however, the percentage increased significantly to 39.2% among the nutrition professionals who graduated after 2009. Finally, the percentage of nutrition professionals that approved the adherence of athletes to the VD increased statistically over time, however, most of them believed that this adherence was only possible with the use of supplements.

De acordo com a Tabela 2 é possível observar que independentemente do AF, a maioria dos profissionais de nutrição não acreditam que a DV seja sinónimo de uma dieta saudável. Em contrapartida, é possível constatar que a maioria dos profissionais de nutrição formados após 2009 (64.7%) aconselham a adesão a esta dieta, ao contrário dos profissionais de nutrição formados até este ano, cuja maioria desaconselha. Em relação aos benefícios da DV a longo e a curto prazo, verificou-se que os profissionais de nutrição formados até 2009 não consideram que esta dieta possa ser benéfica para a saúde, contradizendo a opinião dos profissionais de nutrição formados após esta data. No que toca aos produtos de origem animal, a maioria dos profissionais de nutrição concordam que a ausência destes não torna a dieta mais saudável, no entanto, verifica-se um aumento na percentagem de profissionais de nutrição formados após 2009 que defendem a ideia contrária. Aproximadamente 52% dos profissionais de nutrição formados até 2009 e 72.5% formados após esta data acreditam que, se a DV for equilibrada, todos os nutrientes necessários serão fornecidos. Os resultados, também, mostram que a maioria dos profissionais de nutrição consideraram que há um maior risco de desenvolver anemia perante uma DV, porém, observa-se que há uma diminuição deste pensamento nos profissionais de nutrição formados após 2009. Quanto à utilização desta dieta como método de emagrecimento, em ambos os grupos a maioria dos profissionais de nutrição concordam que não é uma boa estratégia para este efeito. É importante referir que nenhuma destas relações descritas foi estatisticamente significativa.

Não obstante, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto ao facto de ser possível manter uma DV ao longo da vida, onde 81.1% da população geral considera ser possível, sendo que a maioria destes se encontram no grupo que se formou após 2009. Em relação à suplementação, apenas 13% dos profissionais de nutrição formados até 2009 acreditam que é possível aderir à DV sem nenhum tipo de suplementação, no entanto, a percentagem aumenta significativamente para 39.2% nos profissionais de nutrição formados após 2009. Finalmente, a percentagem de profissionais de nutrição que defendeu a adesão de atletas à DV aumentou estatisticamente ao longo do tempo, todavia, a maioria acredita que esta adesão apenas é possível com a utilização de suplementação.

**Table 2** - Opinion of nutrition professionals about the vegetarian diet, depending on their year of formation.  
**Tabela 2** - Opinião dos profissionais de nutrição sobre a dieta vegetariana, em função do seu ano de formação.

	<b>General Population/ População Geral (n=74)</b>	<b>1980 to 2009 (n=23)</b>	<b>2010 to 2019 (n=51)</b>	<b>p- value*</b>
<b>VD is considered a healthy diet / DV é considerada uma dieta saudável</b>	40.5 (30)	47.8 (11)	37.3 (19)	0.391
<b>Not recommend VD / Desaconselha a DV</b>	41.9 (31)	56.5 (13)	35.5 (18)	0.087
<b>VD shows long term benefits / DV apresenta benefícios a longo prazo</b>	52.7 (39)	39.1 (9)	58.8 (30)	0.116
<b>VD shows short term benefits / DV apresenta benefícios a curto prazo</b>	55.4 (41)	39.1 (9)	62.7 (32)	0.059
<b>Keep a VD throughout life / Manter DV ao longo de toda a vida</b>	81.1 (60)	65.2 (15)	88.2 (45)	0.019
<b>Absence of animal products turns VD healthier / Ausência de produtos animais torna a DV mais saudável</b>	8.1 (6)	0.0 (0)	11.8 (6)	0.086
<b>Balanced VD provides all the nutrientes / DV equilibrada fornece todos os nutrientes</b>	62.2 (49)	52.2 (12)	72.5 (37)	0.086
<b>Adherence to VD without the use of supplementation / Adesão à DV sem o uso de suplementação</b>	31.1 (23)	13.0 (3)	39.2 (20)	0.024
<b>Increased risk of anemia / Maior risco de anemia</b>	78.4 (58)	82.6 (19)	76.5 (39)	0.553
<b>VD advisable in athletes / Aconselhável DV em atletas</b>				
Recommend / Aconselho	23.0 (17)	4.3 (1)	31.4 (16)	
Not recommend / Não aconselho	20.3 (15)	26.1 (6)	17.6 (9)	0.038
Only with supplements / Apenas com suplementação	56.8 (42)	69.6 (16)	51.0 (26)	
<b>VD as a weight-loss method / DV como método de emagrecimento</b>	18.9 (14)	17.4 (4)	19.6 (10)	0.822

Data expressed in % (n). \* P-value for comparisons between groups were tested using the Pearson  $\chi^2$  test. Abbreviations: VD, Vegetarian Diet / Dados expressos em % (n). \* P-value para comparações entre grupos foram testados mediante teste de Pearson  $\chi^2$ .  
 Abreviaturas: DV, Dieta Vegetariana.

## Discussion

The present study aimed to evaluate the relationship between YG and the opinion of nutritionists and dietitians concerning the VD, comparing it with the current scientific evidence. In general, nutrition professionals did not consider a VD to be a healthy diet. However, most nutrition professionals who finished their training after 2009 claim that they advise adherence to a VD, which shows some controversy. Nevertheless, it is important to remember that a balanced VD provides a high intake of dietary fibers and health-promoting phytochemicals, due to the consumption of fruits, vegetables, whole grains, legumes, nuts, and various soy products (15,16). Vegetarians usually have a lower body mass index, lower serum levels of total cholesterol and low-density lipoproteins and blood pressure within the reference values, lower mortality rates from ischemic heart disease, and also a decreased incidence of hypertension, stroke, Type 2 DM, and several types of cancer than non-vegetarians (16,17).

Regarding the consideration of a VD as beneficial in the short and long term, and whether its practice is possible throughout life, controversies were observed between the groups. According to some studies, a low-fat vegetarian dietary intervention, free of all animal products, and with whole foods, can provide significant benefits in both, short and long term (16,18,19). A balanced VD, with or without the inclusion of fortified foods or supplements, meets current nutritional recommendations and is appropriate for all stages of the life cycle (20). The VD may have lower protein quality, a reflection of less favorable amino acid profiles and less bioavailability compared to omnivorous diets (21). Only in the case of a improperly planned VD might there be a reduction in caloric intake and nutritional deficiency of fatty acids, proteins, vitamins, and minerals (22). Nevertheless, it has been described that balanced VD's are appropriate for individuals during all stages of life, including pregnancy, lactation, childhood, adolescence, elderly, and athletes (23).

As for the need for food supplements, a VD meets current recommendations regarding all nutrients if done in a balanced way, although more attention is necessary regarding vitamin D, omega-3 fatty acids, calcium, iron, zinc, and iodine. However, the use of food supplements and fortified foods provides security against the deficiency of these micronutrients (15). Therefore, although plant-based diets are at risk for nutritional deficiencies, such as protein, iron, vitamin D, calcium, iodine, and omega-3, the available evidence

## Discussão

O presente estudo teve como intuito avaliar a relação entre o AF e o posicionamento dos nutricionistas e dietistas face à DV, tendo como base de comparação as evidências científicas atuais disponíveis. Em geral, os profissionais de nutrição, não consideram a DV sinônimo de uma dieta saudável. Todavia, a maioria dos profissionais de nutrição formados após 2009 afirmam que aconselham a adesão à DV, o que demonstra uma certa controvérsia. Não obstante, é importante relembrar que uma DV equilibrada fornece uma alta ingestão de fibras alimentares e fitoquímicos promotores de saúde, devido ao consumo de frutas, vegetais, grãos integrais, legumes, nozes e vários produtos de soja (15,16). Os vegetarianos normalmente apresentam menor índice de massa corporal, menores níveis séricos de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade e pressão arterial dentro dos valores de referência, taxas de mortalidade por doença isquêmica do coração mais reduzidas e, também, a diminuição da incidência de hipertensão, acidente vascular cerebral, DM Tipo 2 e vários tipos de cancro, em comparação com os indivíduos omnívoros (16,17).

Em relação à consideração da DV como benéfica a curto e a longo prazo, e se é possível a sua prática ao longo de toda a vida também se observaram controvérsias entre os grupos analisados. De acordo com alguns estudos, uma intervenção dietética vegetariana com pouca gordura saturada, livre de todos os produtos de origem animal e com alimentos integrais pode fornecer benefícios significativos tanto a curto, como a longo prazo (16,18,19). Uma DV equilibrada, com ou sem inclusão de alimentos fortificados ou suplementos, atende às recomendações nutricionais atuais e é apropriada para todas as etapas do ciclo de vida (20). Contudo, é importante relembrar que a DV pode ter menor qualidade proteica, um reflexo de perfis de aminoácidos menos favoráveis e com menor biodisponibilidade, em comparação com dietas omnívoras (21). Somente no caso de uma DV não adequadamente planejada, é que pode haver redução da ingestão calórica e a deficiência nutricional de ácidos gordos, proteínas, vitaminas e minerais (22). Não obstante, foi descrito que as DV equilibradas são apropriadas para indivíduos durante todas as fases do ciclo da vida, incluindo gravidez, lactação, infância, adolescência, velhice e atletas (23).

Quanto à necessidade de suplementos alimentares, a DV atende às recomendações atuais de todos os nutrientes se for feita de modo equilibrado, embora, seja necessário haver uma maior atenção quanto à

shows that well-planned VD diets can be considered safe but require high awareness for a balanced intake of the main nutrients (24). Vitamin B12 is an exception, as it is lacking in a VD and should be obtained through supplements (25). Regarding the question of vegetarians being more likely to develop anemia, studies have shown that the lower the consumption of meat, the lower the serum hemoglobin concentrations and, consequently, the higher the likelihood to be anemic (21,26). Regarding adherence to a VD by athletes, the use of supplements is necessary, which is supported by scientific evidence (27). Well-planned and adequately supplemented VD appears to effectively support athletic performance. According to a study carried out in 2019, vegetarian athletes would have to consume an additional amount of protein to achieve the necessary daily amounts compared to a group of non-vegetarians (28). Most nutrition professionals do not consider a VD as a good weight-loss method. Nevertheless, observational studies demonstrate that vegetarians generally have lower body weights compared to omnivores (29). The prescription of VD reduces the average body weight, suggesting a potential value for the prevention and control of pathologies related to weight (18). According to the *Academy of Nutrition and Dietetics*, the *General Directorate of Health*, and the *World Health Organization*, a properly planned VD, including fully vegetarian diets, are healthy, nutritionally adequate, and can provide health benefits in the prevention and treatment of certain diseases (8). Nevertheless, the results obtained in the present study point to controversy among nutrition professionals, since a percentage of the sample is not in line with scientific evidence, which further highlights the poor consensus that exists between generations.

vitamina D, ácidos gordos omega-3, cálcio, ferro e zinco. Contudo, o uso de suplementos alimentares e alimentos fortificados fornece uma segurança contra a deficiência destes micronutrientes (15). Portanto, embora dietas à base de plantas estejam em risco de deficiências nutricionais, como proteínas, ferro, vitamina D, cálcio, iodo e ômega-3, as evidências disponíveis mostram que dietas DV bem planeadas podem ser consideradas seguras, mas requerem uma forte consciência para uma ingestão equilibrada dos principais nutrientes (24). A exceção remonta à vitamina B12, já que devido à inexistência da mesma numa DV, deverá ser obtida através de suplementos alimentares (25). Relativamente à questão dos vegetarianos serem mais propensos a desenvolverem anemia, estudos demonstram que quanto menor o consumo de carne, mais baixas são as concentrações de hemoglobina sérica, e consequentemente maior a probabilidade de desenvolver anemia (21,26). Em relação à adesão à DV por atletas, pode ser recomendado o uso de suplementos de acordo com as últimas evidências científicas (27). A DV bem planeada e, adequadamente suplementada, parece apoiar, efetivamente, o desempenho atlético. De acordo com um estudo realizado em 2019, os atletas vegetarianos teriam de consumir uma quantidade adicional de proteína para atingirem as quantidades necessárias diárias comparadas a um grupo de não vegetarianos (28). A maioria dos profissionais de nutrição não considera a DV como um bom método de emagrecimento. Não obstante, estudos observacionais demonstram que os vegetarianos, geralmente, demonstram pesos corporais mais baixos em comparação com os omnívoros (29). A prescrição de dietas vegetarianas reduz o peso corporal médio, sugerindo um potencial valor para prevenção e controlo de patologias relacionadas ao peso (18). Segundo a Academia de Nutrição e Dietética, a Direção Geral de Saúde e a Organização Mundial de Saúde, as DV adequadamente planeadas, incluindo dietas totalmente vegetarianas, são saudáveis, nutricionalmente adequadas e podem fornecer benefícios à saúde na prevenção e tratamento de certas doenças (8). Não obstante, os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma controvérsia entre os profissionais de nutrição, já que uma percentagem da amostra não está em sintonia com as evidências científicas, o que faz destacar ainda mais o pouco consenso existente entre gerações.

## Conclusion

It was possible to observe an impact of YG on the opinion of nutrition professionals regarding adherence to a VD, as divergence between the two groups analyzed was noted. However, both groups demonstrated complete knowledge of the most recent scientific evidence. Through this study, there is a need for interventions to encourage updating and professional training of the nutrition professionals, along with participation in discussions and debates that can improve the understanding, confidence, interpretation, and the use of scientific literature to evaluate and apply these concepts in their daily practice.

## Authors Contributions Statement

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

## Funding

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

## Acknowledgments

The authors acknowledge all the participants.

## Conflict of Interests

A.A, L.V, M.R, and C.F.-P. report no conflicts of interest.

## Conclusões

Foi possível observar o impacto que o AF tem sobre o posicionamento dos profissionais de nutrição sobre a DV, notando-se uma divergência entre os dois grupos analisados. Contudo, nenhum dos dois grupos demonstrou conhecimento total sobre a evidência científica mais recente. Através deste estudo destaca-se a necessidade de intervenções dos órgãos superiores para o incentivo da atualização e da formação profissional, da participação em discussões e debates que podem melhorar a compreensão, confiança, interpretação e uso da literatura científica por parte dos profissionais de nutrição, para que possam avaliar e aplicar estes conteúdos na sua prática diária.

## Declaração sobre as contribuições do autor

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

## Financiamento

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

## Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes.

## Conflito de Interesses

A.A, L.V., M.R., C.F.-P. não têm conflitos de interesse a reportar.



## References / Referências

1. Kraig, B., & Spencer, C. (1997). The Heretic's Feast: A History of Vegetarianism. *The American Historical Review*, 102(1), 85. <https://doi.org/10.2307/2171268>
2. Ross, A. C., Caballero, B. H., Cousins, R. J., Tucker, K. L., & Ziegler, T. R. (2012). *Modern nutrition in health and disease: Eleventh edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP). <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/modern-nutrition-in-health-and-disease-eleventh-edition>
3. Pinho, J. P., Silva, S. C. G., Borges, C., Santos, C. T., Santos, A., Guerra, A., & Graça, P. (2016). Alimentação Vegetariana em Idade Escolar (Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável; Direção-Geral da Saúde (ed.)). [http://www.apn.org.pt/xFiles/scContentDeployer\\_pt/docs/doc1566.pdf](http://www.apn.org.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/doc1566.pdf)
4. Alvarez-Kalverkamp, M., Bayer, W., Becheva, S., Benning, R., Börnecke, S., Chemnitz, C., Sharma, S. (2014). Meat atlas, Facts and figures about the animals we eat. Heinrich Böll Stiftung and Friends of the Earth Europe. Ahrensfelde, Germany. Retrieved from [www.boell.de/fleischatlas](http://www.boell.de/fleischatlas)
5. Centro Vegetariano. (2017). 120 000 vegetarianos - Número quadruplica em 10 anos. Centro Vegetariano. <https://www.centrovegetariano.org/Article-620-Numero-vegetarianos-quadruplica-10-anos-Portugal.html>
6. Mitek, M., Azyewska, A., & Wawrzyniak, A. (2013). Estimated dietary intakes of nitrates in vegetarians compared to a traditional diet in Poland and acceptable daily intakes: is there a risk? *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2), 105–109.
7. Redwood, D., & Shealy, C. N. (2005). The China Study: The Most Comprehensive Study of Nutrition Ever Conducted and the Startling Implications for Diet, Weight Loss and Long-Term Health. Two Reviews. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 11(6), 1117–1119. <https://doi.org/10.1089/acm.2005.11.1117>
8. Craig, W. J., & Mangels, A. R. (2009). Position of the American Dietetic Association: vegetarian diets. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(7), 1266–1282. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.05.027>
9. Pereira, P. M., & Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat science*, 93(3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
10. Ekmekcioglu, C., Wallner, P., Kundi, M., Weisz, U., Haas, W., & Hutter, H. P. (2018). Red meat, diseases, and healthy alternatives: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 247–261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1158148>
11. Wolk A. (2017). Potential health hazards of eating red meat. *Journal of internal medicine*, 281(2), 106–122. <https://doi.org/10.1111/joim.12543>
12. Goethals, S., Rombouts, C., Hemeryck, L. Y., Van Meulebroek, L., Van Hecke, T., Vossen, E., Van Camp, J., De Smet, S., & Vanhaecke, L. (2020). Untargeted Metabolomics to Reveal Red versus White Meat–Associated Gut Metabolites in a Prudent and Western Dietary Context. *Molecular Nutrition and Food Research*, 64(12), 2000070. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000070>
13. American Dietetic Association, & Dietitians of Canada (2003). Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: Vegetarian diets. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(6), 748–765. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50142>
14. Cruchet, S., Lucero, Y., & Cornejo, V. (2016). Truths, Myths and Needs of Special Diets: Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, Autism, Non-Celiac Gluten Sensitivity, and Vegetarianism. *Annals of nutrition & metabolism*, 68 Suppl 1, 43–50. <https://doi.org/10.1159/000445393>
15. Craig W. J. (2010). Nutrition concerns and health effects of vegetarian diets. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 25(6), 613–620. <https://doi.org/10.1177/0884533610385707>
16. Dinu, M., Abbate, R., Gensini, G. F., Casini, A., & Sofi, F. (2017). Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3640–3649. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1138447>
17. Parker, H. W., & Vadiveloo, M. K. (2019). Diet quality of vegetarian diets compared with nonvegetarian diets: a systematic review. *Nutrition reviews*, 77(3), 144–160. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy067>
18. Barnard, N. D., Levin, S. M., & Yokoyama, Y. (2015). A Systematic Review and Meta-Analysis of Changes in Body Weight in Clinical Trials of Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(6), 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.11.016>
19. McDougall, J., Litzau, K., Haver, E., Saunders, V., & Spiller, G. A. (1995). Rapid reduction of serum cholesterol and blood pressure by a twelve-day, very low fat, strictly vegetarian diet. *Journal of the American College of Nutrition*, 14(5), 491–496. <https://doi.org/10.1080/07315724.1995.10718541>
20. Cullum-Dugan, D., & Pawlak, R. (2015). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(5), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.02.033>
21. Tong, T. Y., Key, T. J., Gaitskell, K., Green, T. J., Guo, W., Sanders, T. A., & Bradbury, K. E. (2019). Hematological parameters and prevalence of anemia in white and british indian vegetarians and nonvegetarians in the UK Biobank. *American Journal of Clinical Nutrition*, 110(2), 461–472. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz072>
22. Sakkas, H., Bozidis, P., Touzios, C., Kolios, D., Athanasiou, G., Athanasopoulou, E., Gerou, I., & Gartzonika, C. (2020). Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(2), 88. <https://doi.org/10.3390/medicina56020088>
23. Teixeira, D., Pestana, D., Calhau, M., Vicente, L., & Graça, P. (2015). Alimentação e nutrição na gravidez. Direção Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável.
24. Sebastiani, G., Barbero, A. H., Borrás-Novell, C., Casanova, M. A., Aldecoa-Bilbao, V., Andreu-Fernández, V., Tutusaus, M. P., Martínez, S. F., Roig, M. D. G., & García-Algar, O. (2019). The effects of vegetarian and vegan diet during pregnancy on the health of mothers and offspring. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030557>
25. García-Maldonado, E., Gallego-Narbón, A., & Vaquero, M. P. (2019). Are vegetarian diets nutritionally adequate? A revision of the scientific evidence. *Nutricion Hospitalaria*, 36(4), 950–961. <https://doi.org/10.20960/nh.02550>
26. Larpin, C., Wozniak, H., Genton, L., & Serratrice, J. (2019). Vegetarian and vegan diets and their impact on health. *Revue Medicale Suisse*, 15(667), 1849–1853.
27. Barr, S. I., & Rideout, C. A. (2004). Nutritional considerations for vegetarian athletes. In *Nutrition* (Vol. 20, Issues 7–8, pp. 696–703). Nutrition. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.04.015>
28. Ciuris, C., Lynch, H. M., Wharton, C., & Johnston, C. S. (2019). A comparison of dietary protein digestibility, based on diaas scoring, in vegetarian and non-vegetarian athletes. *Nutrients*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/nu1123016>
29. Huang, R. Y., Huang, C. C., Hu, F. B., & Chavarro, J. E. (2016). Vegetarian Diets and Weight Reduction: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of General Internal Medicine*, 31(1), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11606-015-3390-7>

## Body composition assessment of vegetarian-vegan and omnivore young women – an exploratory study

*Avaliação da composição corporal de mulheres jovens vegetarianas e omnívoras - um estudo exploratório*

Cíntia Ferreira-Pêgo <sup>1\*</sup>, Rejane Giacomelli Tavares <sup>1</sup>, Sofia Lopes <sup>2</sup>, Tatiana Fontes <sup>1</sup>, Luís Monteiro Rodrigues <sup>1</sup>

<sup>1</sup>CBIOS – Universidade Lusofona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>School of Health Sciences and Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

\*corresponding author: cintia.pegno@ulusofona.pt

### Abstract

Diet is commonly accepted as a determinant of body composition, especially when related to specific lifestyles. Vegetarian-vegan diets, which involve a reduction or elimination of animal product consumption, are believed to be more “healthy,” facilitating weight control and reducing the incidence and clinical course of different diseases, in particular those related to overweight and obesity. Global reviews and metanalysis on these issues, however, are still insufficient. Our preliminary approach addresses the total body composition differences among vegetarians-vegans and omnivorous individuals. This cross-sectional study involved ten healthy women, five vegetarian-vegan, and five omnivores (mean 28.10 years old). Body composition was assessed using a dual-energy x-ray absorptiometry (DXA Lunar Prodigy Advance - General Electric Healthcare®). Other general and sociodemographic variables were also collected by trained dietitians. Our results have shown that the vegetarian-vegan group had a non-significantly lower volume of all types of body mass (total bone, fat, lean, tissue, and fat-free) evaluated. Additionally, the vegetarian-vegan group presented higher values of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue (286.20 and 11138.40 cm<sup>3</sup>, respectively,  $p > 0.05$ ) compared to the omnivore group. These differences will be further confirmed in subsequent studies.

**Keywords:** Body composition; visceral adipose tissue; subcutaneous adipose tissue; vegetarian-vegan diet; Dual-energy x-ray absorptiometry

### Resumo

A dieta é geralmente aceite como determinante da composição corporal, especialmente quando relacionada com estilos de vida específicos. Acredita-se que as dietas vegetarianas-veganas que envolvem uma redução ou eliminação do consumo de produtos animais, são mais "saudáveis" facilitando o controlo do peso e reduzindo a incidência e o curso clínico de diferentes doenças. No entanto, as revisões e meta-análises sobre estas questões são ainda insuficientes. A nossa abordagem preliminar aborda as diferenças na composição corporal total entre vegetarianos-vegan e indivíduos omnívoros. Este estudo transversal envolveu dez mulheres saudáveis, cinco vegetarianas-veganas, e cinco omnívoras (média de 28,10 anos de idade). A composição corporal foi avaliada utilizando uma absorptiometria de raios X de dupla energia (DXA Lunar Prodigy Advance - General Electric Healthcare®). Outras variáveis gerais e sociodemográficas foram também recolhidas por nutricionistas treinados. Os resultados mostraram que o grupo vegetariano-vegan teve um volume inferior não significativo de qualquer tipo de massa (osso, gordura, massa magra, tecido, tecido livre de gordura) avaliada. Além disso, estas mulheres jovens vegetarianas-vegan apresentaram valores mais elevados de tecido adiposo visceral e tecido adiposo subcutâneo (286,20 e 11138,40 cm<sup>3</sup>, respetivamente,  $p > 0,05$ ) em comparação com o grupo omnívoro. Estas diferenças serão ainda confirmadas em estudos subsequentes.

**Palavras-chave:** Composição corporal; tecido adiposo visceral; tecido adiposo subcutâneo; dieta vegetariana; absorptiometria de raios X de dupla energia

## Introduction

Diet seems to have a significant influence on the development of adiposity, obesity, and cardiometabolic diseases (1). It is also clear that excess body fat is an established risk factor for many disease conditions and premature death (2).

Plant-based diets such as vegetarianism and veganism are believed to reduce body weight because of the overall decreased caloric intake and increased thermogenesis. These diets are most simply defined by a reduction or elimination of the consumption of animal products and based on the consumption of grains, legumes, vegetables, fruits, and nuts (3). However, it should be noted that reductions in body weight do not necessarily result in reductions in adipose tissue neither directly translate into improved health outcomes (4). Nevertheless, the vegetarian diet is reported as being an effective means for the prevention and treatment of cardio-metabolic diseases (3). The Academy of Nutrition and Dietetics, the world's largest organization of food and nutrition professionals founded in 1917, recognizes the health and nutritional benefits for the prevention and treatment of certain diseases potentially related to vegetarian-vegan diets (5). Healthy, properly planned vegetarian diets were described as effective for glycemic control while providing metabolic and cardiovascular benefits, including the control of atherosclerosis dyslipidemia and blood pressure (3). These cardio-metabolic benefits were reported to be greater with vegan than lacto-ovo-vegetarian diets (6). However, the body composition of vegetarian and vegan individuals has not been sufficiently studied, and commonly-used assessments of waist circumference, body weight, or Body Mass Index (BMI) do not reveal body composition nor fat distribution. Therefore, the main goal of the present study was to approach and compare the body composition - bone mass, fat mass, lean mass, tissue mass, fat-free mass, total mass, and visceral and subcutaneous adipose tissue - of young healthy adult women with different diet regimes (vegetarian-vegan vs. omnivore) by referenced methods.

## Introdução

A dieta parece ter uma influência significativa no desenvolvimento da obesidade e das doenças cardiometabólicas (1). É também evidente que o excesso de gordura corporal é um fator de risco estabelecido para muitas doenças e até para a morte prematura (2).

Acredita-se que as dietas baseadas em plantas como o vegetarianismo e o veganismo reduzem o peso corporal devido à diminuição global da ingestão calórica e ao aumento da termogênese. Estas são basicamente definidas por uma redução ou eliminação do consumo de produtos animais, sendo baseadas no consumo de grãos, legumes, vegetais, frutas e frutos secos (3). Contudo, é de notar que as reduções no peso corporal não resultam necessariamente em reduções no tecido adiposo nem se convertem diretamente em melhores resultados para a saúde (4). No entanto, a dieta vegetariana é relatada como sendo um meio eficaz para a prevenção e tratamento de doenças cardiometabólicas (3). A Academia de Nutrição e Dietética, a maior organização mundial de profissionais de alimentação e nutrição fundada em 1917, reconhece os benefícios para a saúde e nutrição para a prevenção e tratamento de certas doenças potencialmente relacionadas com as dietas vegetarianas (5). Dietas vegetarianas saudáveis e devidamente planeadas foram descritas como eficazes para o controlo glicémico, proporcionando ao mesmo tempo benefícios metabólicos e cardiovasculares, incluindo o controlo da dislipidemia e da pressão arterial (3). Estes benefícios cardiometabólicos foram reportados como sendo maiores com as dietas veganas do que as ovo-lacto-vegetarianas (6). Contudo, a composição corporal dos indivíduos vegetarianos e veganos não é suficientemente estudada, tendo também em conta que as avaliações da circunferência da cintura, peso corporal, ou Índice de Massa Corporal (IMC) não revelam a composição corporal nem a distribuição da gordura. Portanto, o principal objetivo do presente estudo foi abordar e comparar a composição corporal - massa óssea, massa gorda, massa magra, massa tecidual, massa sem gordura, massa total, e tecido adiposo visceral e subcutâneo, de jovens mulheres adultas saudáveis com diferentes regimes alimentares (vegetarianos-veganos vs. omnívoros) através de métodos referenciados.

## Materials and Methods

### *Study design and participants*

The present study was an observational, quantitative, and cross-sectional analysis designed to evaluate total body composition in vegetarian-vegan individuals and comparing it with omnivore diet participants.

A convenience sample of ten participants (five vegetarian-vegan, and five omnivores) all women presenting a mean age of 28.10 (SD: 6.94) years old were selected from the university's student body. Participants were selected following previously defined inclusion/ non-inclusion criteria. Apart from gender, non-inclusion criteria included any kind of disease or health alteration, taking any sort of medication, being pregnant or breastfeeding, and being in the first week of their menstrual cycle. All participants agreed to participate in the study, giving their informed written consent. Procedures respected the principles of good clinical practice adopted for human research studies complying with good clinical practice ethical standards for human research (7). Participants' socio-demographics (age, course year, residence, and other lifestyle habits) were obtained and a Food Frequency Questionnaire and a 3-day dietary recall were also collected for each participant.

### *Body composition assessment*

Weight was measured on an electronic scale [0.1 kg (0.1-200 kg) accuracy], wearing light clothing and no shoes. Height was a self-reported variable used to calculate BMI by the formula [BMI = weight (kg)/height (m<sup>2</sup>)].

The Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA Lunar Prodigy Advance - General Electric Healthcare®; Chicago, Illinois, USA) was used to measure bone mass, fat mass, lean mass, tissue mass, fat-free mass, total mass, and visceral and subcutaneous adipose tissue. Before each whole-body scan, DXA was calibrated according to the manufacturer's instructions via a standard calibration block. Measurements were performed under at least four hours of fasting conditions and without exercise the previous 24 hours to ensure adequate hydration conditions. Participants removed shoes, socks, and all jewelry. Wearing underwear or close-fitting clothing with no metallic pieces, participants were instructed to lie supine on the scanning bed with hands by their sides, not touching the body. During all body scans, participants were asked to remain motionless, and Velcro straps were situated

## Material e Métodos

### *Desenho do estudo e participantes*

O presente estudo foi uma análise observacional, quantitativa e transversal concebida para avaliar a composição corporal total em indivíduos vegetarianos-veganos e compará-la com os participantes omnívoros.

Uma amostra de conveniência de dez participantes (cinco vegetarianos-veganos, e cinco omnívoros) todas mulheres com uma idade média de 28,10 (DP: 6,94) anos foram selecionadas do corpo estudantil da universidade. Os participantes foram selecionados de acordo com critérios de inclusão/ não-inclusão previamente definidos. Para além do sexo, os critérios de não-inclusão incluíam qualquer tipo de doença ou alteração de saúde, tomar qualquer tipo de medicação, estar grávida ou a amamentar, e estar na primeira semana do seu ciclo menstrual. Todos os participantes concordaram em participar no estudo, dando o seu consentimento informado por escrito. Os procedimentos respeitaram os princípios de boas práticas clínicas adotados para estudos de investigação em humanos, cumprindo as normas éticas de boas práticas clínicas para a investigação em humanos (7). Foram obtidos os dados sociodemográficos dos participantes (idade, ano de curso, residência, e outros hábitos de vida) e foram também recolhidos dados alimentares mediante um Questionário de Frequência Alimentar um diário alimentar de 3 dias para cada participante.

### *Avaliação da composição corporal*

O peso foi medido numa balança eletrónica [0,1 kg (0,1-200 kg) de precisão], usando roupas leves e sem sapatos. A altura foi uma variável auto reportada utilizada para calcular o IMC através da fórmula [IMC = peso (kg)/altura (m<sup>2</sup>)].

A absorptiometria de raios X de dupla energia (DXA Lunar Prodigy Advance - General Electric Healthcare®; Chicago, Illinois, EUA) foi utilizada para medir massa óssea, massa gorda, massa magra, massa de tecido, massa livre de gordura, massa total, e tecido adiposo visceral e subcutâneo. Antes de cada scan de corpo inteiro, o DXA foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante através de um bloco de calibração padrão. As medições foram realizadas sob pelo menos quatro horas de jejum e sem exercício nas 24 horas anteriores para assegurar condições de hidratação adequadas. Os participantes removeram sapatos, meias, e todas as joias, vestiram roupa interior, ou roupa apertada sem partículas de metal, e foram instruídos a deitar-se em

around the ankles and knees. All participants on the DXA scanning bed were positioned on the scanning bed by the same trained researcher. Scans lasted approximately 5 to 10 minutes. The researcher analyzed each scan to adjust software-determined regions of interest before producing the whole-body report.

### *Statistical analysis*

Data were presented either as means and standard deviation (SD) for continuous variables or percentages and absolute frequencies for dichotomous variables. The normality of the variables was tested. As all followed a normal distribution, the distribution of the selected characteristics between groups was tested using  $\chi^2$  tests for categorical variables or Student's t-tests for continuous variables. All statistical tests were two-tailed and the significance level was set at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the SPSS software version 27.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## **Results**

The general characteristics of the studied population according to its dietary pattern are summarized in Table 1. Omnivorous women were statistically taller than the vegan-vegetarian group, however, this difference does not affect BMI since no other differences in body weight were found. Sleeping hours were also statistically different between the groups analyzed, as participants following an animal-product diet slept fewer hours compared to the vegetarian group. No other statistically relevant differences were found.

The total population presented a mean bone mass of 2285.30 g, 18983.60 g of fat mass, 40532.60 g of lean mass, 59516.10 g of tissue mass, 42817.80 g of fat-free mass, and finally 63.40 kg of total body mass. Vegetarian-vegan women presented lower volume of all body mass types. However, none of these differences were statistically significant. The results are shown in Figure 1.

posição supino no leito de varredura com as mãos pelos lados, não tocando o corpo. Durante todas as varreduras do corpo, foi pedido aos participantes que permanecessem imóveis, enquanto as tiras de velcro se situavam à volta dos tornozelos e joelhos. As varreduras duraram aproximadamente 5 a 10 minutos. O mesmo investigador posicionou todos os participantes no leito de varrimento DXA. Além disso, o investigador treinado analisou cada varredura para ajustar as regiões de interesse determinadas pelo software antes de produzir o relatório de corpo inteiro.

### *Análise estatística*

Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou percentagens e frequências absolutas para variáveis dicotômicas. A normalidade das variáveis foi testada, e todas elas seguiram uma distribuição normal, por este motivo, a distribuição das características selecionadas entre grupos foi testada utilizando os testes  $\chi^2$  para variáveis categóricas ou os testes t de Student para variáveis contínuas. Todos os testes estatísticos foram bi-caudais e o nível de significância foi fixado em  $P < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS versão 27.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA).

## **Resultados**

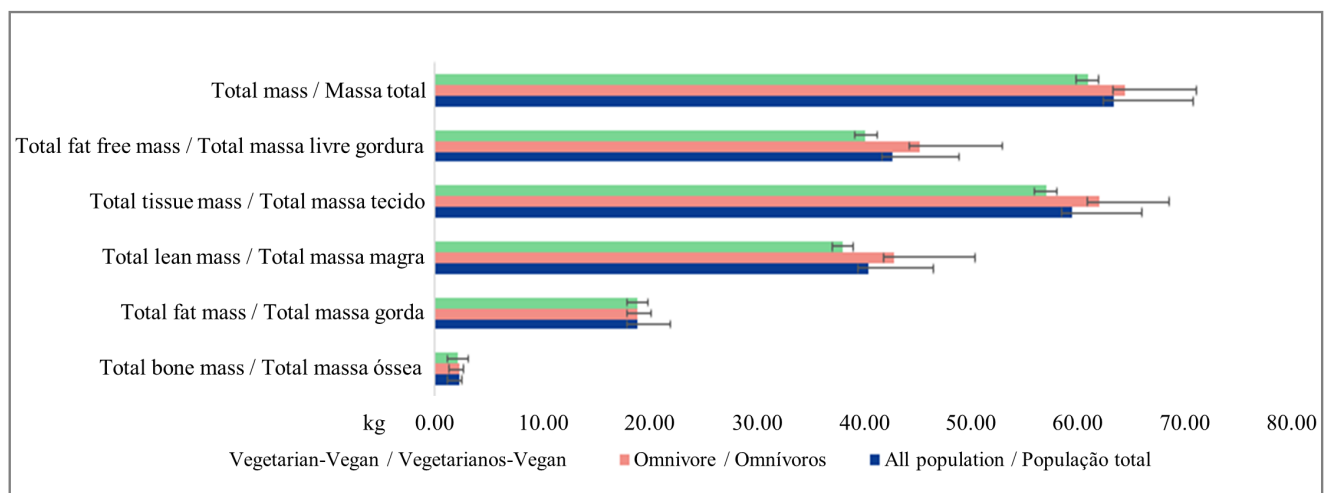
As características gerais da população estudada de acordo com o seu padrão dietético estão resumidas na Tabela 1. As mulheres omnívoras foram estatisticamente mais altas em comparação com o outro grupo analisado, contudo, esta diferença não afeta o IMC uma vez que não foram encontradas outras diferenças no peso corporal. As horas de sono também foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos analisados, uma vez que os participantes que seguem uma dieta de origem animal dormiram menos horas em comparação com o grupo vegetariano. Não foram encontradas outras diferenças estatisticamente relevantes.

A população total apresentou uma massa óssea média de 2285,30 g, 18983,60 g de massa gorda, 40532,60 g de massa magra, 59516,10 g de massa tecidual, 42817,80 g de massa sem gordura, e finalmente 63,40 kg da massa total. As mulheres vegetarianas-vegetarianas apresentaram um volume mais baixo de todo o tipo de massa corporal. No entanto, nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa. Estes resultados podem ser observados na Figura 1.

**Table 1** - General characteristics of the population according to dietary pattern.  
**Tabela 1** - Características gerais da população de acordo com o padrão alimentar.

	Total population/ População total (n=10)	Omnivore/ Omnívoros (n=5)	Vegetarian-Vegan/ Vegetarianos-Vegan (n=5)	p-value <sup>a</sup>
Age, years / Idade, anos	28.10 (6.94)	25.60 (4.56)	30.60 (8.47)	0.054
Height, m / Altura, m	1.65 (0.06)	1.68 (0.02)	1.61 (0.07)	0.003
Weight, kg / Peso, kg	61.78 (6.81)	64.30 (6.60)	59.26 (6.71)	0.847
BMI, kg/m <sup>2</sup> / IMC, kg/m <sup>2</sup>	22.75 (1.48)	22.75 (1.75)	22.76 (1.36)	0.938
Smoking habits / Hábito tabágico, % (n)	30.00 (3)	40.00 (2)	20.00 (1)	0.490
Practice of physical exercise / Prática de exercício físico, % (n)	90.00 (9)	100.00 (5)	80.00 (4)	0.292
Sleep, hours / Sono, horas	7.28 (1.12)	6.38 (1.18)	8.00 (0,00)	0.014
Year of course, years / Ano do curso, anos	2.70 (1.42)	2.80 (1.64)	2.60 (1.34)	0.515
Working student / Trabalhador-estudante, % (n)	30.00 (3)	40.00 (2)	20.00 (1)	0.490
Environment of residence / Ambiente de residência, % (n)				
Rural / Rural	20.00 (2)	20.00 (1)	20.00 (1)	1.000
Urban / Urbano	80.00 (8)	80.00 (4)	80.00 (4)	
Monthly family income / Rendimentos familiares mensais, % (n)				
<1000€	22.20 (2)	40.00 (2)	0.00 (0)	0.151
>1000€	77.80 (7)	60.00 (3)	100.00 (4)	

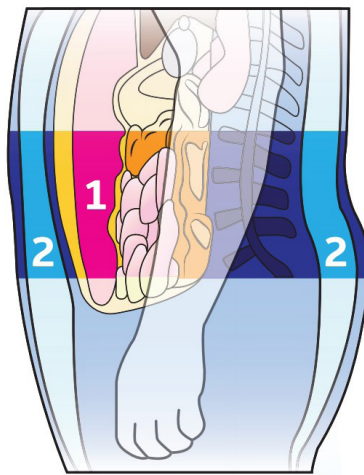
Data expressed as percentage (n) or mean (SD) for categorical or continuous variables, respectively. Abbreviations: BMI, Body Mass Index / Dados expressos em percentagem (n) ou média (desvio padrão) para variáveis categóricas ou contínuas, respetivamente. Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal



**Figure 1** - Body mass distribution according to dietary pattern. Data expressed as mean (SD).  $p$ -value>0.05  
**Figura 1** - Distribuição de tecido corporal de acordo com o padrão alimentar. Dados expressos como média (desvio padrão). Valor de  $p$ >0.05.

Figure 2 shows the areas of the adipose tissue calculation. Values regarding the visceral adipose tissue (VAT) and the subcutaneous adipose tissue (SAT) distribution for the entire studied population are summarized in Table 2, along with a comparison between vegetarian-vegan and omnivore participants. The total population presented a mean of 254.10 cm<sup>3</sup>, 240.30 g, and 29.60 cm<sup>2</sup> of VAT, and 966.40 cm<sup>3</sup>, 911.60 g, and 109.70 cm<sup>2</sup> of SAT. Vegetarian-vegan participants presented higher values of VAT and SAT (281.00 and 1025.00 cm<sup>3</sup>, respectively) compared to the omnivore group (219.17 and 831.00 cm<sup>3</sup>, respectively). None of these differences were statistically significant ( $p$ -value>0.05).

A Figura 2 mostra as áreas de cálculo do tecido adiposo. Os valores relativos ao tecido adiposo visceral (TAV) e a distribuição do tecido adiposo subcutâneo (TAS) para toda a população estão resumidos na Tabela 2, onde também é mostrada a comparação entre os participantes vegetarianos-veganos e omnívoros. A população total apresentou uma média de 254,10 cm<sup>3</sup>, 240,30 g, e 29,60 cm<sup>2</sup> de TAV, e também 966,40 cm<sup>3</sup>, 911,60 g, e 109,70 cm<sup>2</sup> de TAS. Os participantes vegetarianos-veganos apresentaram valores mais elevados de TAV e TAS (281,00 e 1025,00 cm<sup>3</sup>, respectivamente) em comparação com os omnívoros (219,17 e 831,00 cm<sup>3</sup>, respectivamente). Nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa ( $p$ -valor>0,05).



**Figure 2** - Schematic representation of tissue distribution of the VAT (1) and the SAT (2) within the android region. [Image: General Electric Company. Reproduced with permission.]

**Figura 2** - Representação esquemática da distribuição dos tecidos do TAV (1) e do TAS (2) dentro da região androide. [Imagem: General Electric Company. Reproduzido com permissão.]

**Table 2** - Visceral and subcutaneous adipose tissue distribution according to dietary pattern.

**Tabela 2** - Distribuição de tecido adiposo visceral e subcutâneo de acordo com o padrão alimentar.

	Total population / População total (n=10)	Omnivore / Omnívoros (n=5)	Vegetarian-Vegan / Vegetarianos-Vegan (n=5)	$p$ -value <sup>a</sup>
VAT / TAV, cm <sup>3</sup>	254.10 (112.38)	222.00 (124.75)	286.20 (101.38)	0.749
VAT / TAV, grams	240.30 (105.90)	210.20 (101.38)	270.40 (96.23)	0.742
VAT / TAV, cm <sup>2</sup>	29.60 (13.53)	24.80 (13.65)	34.40 (12.97)	0.651
SAT / TAS, cm <sup>3</sup>	966.40 (427.33)	794.40 (210.17)	11138.40 (210.17)	0.284
SAT / TAS, grams	911.60 (403.28)	749.00 (198.33)	1074.20 (510.39)	0.284
SAT / TAS, cm <sup>2</sup>	109.70 (47.04)	86.60 (22.17)	132.80 (56.16)	0.250

## Discussion

Obesity and type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) represent major risks to develop cardiovascular diseases (CVD), and insulin resistance related to adipose tissue (white and visceral) and pancreatic  $\beta$ -cells impairment are currently indicated as the primary mechanisms of T2DM (8), these links between obesity, insulin resistance, and CVD have recently drawn more attention to the importance of diet as part of lifestyle and thus a potentially effective way to help prevent these recognized major health burdens, associated or not to physical exercise and activity (9).

Plant-based diets have been described as reducing body fat via a variety of mechanisms, which cumulatively lead to reduced caloric intake and increased energy expenditure (4). These mechanisms might include the reduced caloric density of the overall diet and improved satiety, in part due to gut microbiota alterations (4). Additionally, increased insulin sensitivity, and a potential increase in white adipose tissue, contribute to increasing thermogenesis (4). Plant-based diets have also been consistently associated with reduced body weight in interventional trials (10,11). No matter this very small sample and exploratory character, our results have found no differences in BMI or weight between vegetarian and non-vegetarian participants. No statistical differences were observed regarding the fat mass distribution between those two groups. The vegetarian – vegan group depicted non-statistical higher VAT and SAT values, compared to the omnivore group. In recent years, excess VAT, also referred as visceral obesity, has been recognized as a major predictor of cardiometabolic disease and all-cause mortality independent of BMI and general obesity (12,13). Moreover, VAT is highly metabolically active and contributes to systemic inflammation, and has been assumed to be the common key element and driver of the cardiometabolic risk associated to the metabolic syndrome (14). Data available to date suggests a role for both VAT and SAT in chronic cardiometabolic disease (15). It has been argued that excess abdominal adipose tissue is a consequence of today's modern, sedentary lifestyle patterns, including nutrition and dietary behaviour (13). Inherently, the relationship between dietary intake and health outcomes such as VAT and SAT is very complex, with interactions that are not captured by studying only single dietary components (16).

## Discussão

A obesidade e a Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) representam grandes riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), sendo atualmente aceite que a resistência à insulina relacionada com o tecido adiposo (branco e visceral) assim como o pâncreas - a deficiência de células  $\beta$  - representam os mecanismos primários do DM2 (8). Atualmente, estas ligações entre obesidade, resistência à insulina e DCV têm chamado a atenção para a importância da dieta como parte do estilo de vida e, portanto, uma forma potencialmente eficaz de ajudar a prevenir estes reconhecidos grandes fardos, associados ou não ao exercício físico e à atividade (9).

As dietas à base de plantas foram descritas como uma forma de reduzir a gordura corporal através de uma variedade de mecanismos, que cumulativamente levam à redução do consumo calórico e aumentam o gasto energético (4). Estes mecanismos podem incluir a redução da densidade calórica global da dieta e a melhoria da saciedade, em parte devido a alterações da microbiota intestinal (4). Além disso, o aumento da sensibilidade à insulina, e um potencial aumento do tecido adiposo branco contribuem para aumentar a termogénese (4). As dietas à base de plantas também têm sido consistentemente associadas à redução do peso corporal em ensaios intervencionais (10,11). Independentemente da amostra reduzida e do carácter exploratório do estudo, os nossos resultados não encontraram diferenças estatísticas no IMC ou peso corporal entre os participantes vegetarianos e não vegetarianos. Não foram observadas diferenças estatísticas relativamente à distribuição da massa gorda entre estes dois grupos. O grupo vegetariano-vegan apresentou valores de TAV e TAS não estatisticamente mais elevados, em comparação com o grupo omnívoro. Nos últimos anos, o excesso de TAV também denominado obesidade visceral foi reconhecido como um grande preditor de doenças cardiometabólicas e mortalidade por todas as causas, independentemente do IMC e da obesidade geral (12,13). Além disso, o TAV, que é altamente ativo metabolicamente e contribui para a inflamação sistémica, foi assumido como sendo um elemento chave comum e motor do risco cardiometabólico associado à síndrome metabólica (14). Até à data, os dados disponíveis sugerem um papel tanto do TAV como do TAS na doença cardiometabólica crónica (15). Tem-se argumentado que o excesso de tecido adiposo abdominal é uma consequência dos atuais padrões de vida modernos e sedentários, incluindo nutrição e comportamento dietético (13).



We might easily agree that no diet, independently, is more healthy than another. In all cases, the diet needs to be properly planned regarding its macro and micronutrient contents and the type of food products chosen (17).

To the best of our knowledge, this is the first published report detecting higher values of VAT and SAT with detailed body mass scanning in vegetarian-vegan young women and compared to a similar omnivore population. The reduced sample is an obvious constraint, limiting our interpretation. Still noninvasive imaging technologies such as DXA are validated to quantify the specific amounts of VAT and SAT in the body (18), and DXA analysis is regarded for that purpose as a “gold-standard”. Its accessibility and cost may explain the limited numbers of large scale epidemiological studies using this technique. Since SAT is the biggest reserve of VAT, these results should be further studied with special interest in healthy and normal weight and BMI individuals to better understand its relationship with diet and food group(s) consumption in healthy and non-healthy individuals.

## Conclusion

This exploratory study revealed some (not statistically significant) differences between healthy volunteers following vegetarian-vegan and omnivorous dietary patterns. Vegetarian-vegan participants have shown consistently lower mass volumes (total bone mass, fat mass, lean mass, tissue mass, and fat-free mass) and higher levels of subcutaneous and visceral adipose tissue when compared with the omnivore group,

Inerentemente, a relação entre o consumo dietético e os resultados de saúde, como o TAV e o TAS, é muito complexa (16).

Poderíamos facilmente concordar que nenhuma dieta é por si só mais saudável do que outras. Em qualquer caso, a dieta precisa de ser devidamente planeada em relação ao seu conteúdo em macro e micronutrientes e ao tipo de produtos alimentares escolhidos (17).

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro relatório publicado que deteta valores mais elevados de TAV e TAS com DXA em mulheres jovens vegetarianas e em comparação com uma população omnívora semelhante. A amostra reduzida é um constrangimento óbvio, limitando a nossa interpretação. Tecnologias de imagem ainda não invasivas como o DXA são validadas para quantificar os montantes específicos de TAV e TAS no organismo (18), e a análise DXA é considerada para esse efeito, como um método “padrão dourado”. A sua acessibilidade e o seu custo explicam tão poucos estudos epidemiológicos em larga escala utilizando esta técnica. Uma vez que o TAS é a maior reserva de TAV, estes resultados devem ser estudados com especial interesse em indivíduos saudáveis e normoponderais para melhor compreender a sua relação com a dieta e o consumo de grupos alimentares em indivíduos saudáveis e não saudáveis.

## Conclusões

Este estudo exploratório revelou algumas diferenças (não estatisticamente significativas) entre dois grupos dietéticos. Os participantes vegetarianos-veganos mostraram consistentemente volumes de massa mais baixos (massa óssea total, massa gorda, massa magra, massa tecidual e massa sem gordura) e níveis mais elevados de tecido adiposo subcutâneo e visceral quando comparados com o grupo omnívoro.

## Authors Contributions Statement

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

## Funding

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

## Acknowledgements

The authors acknowledge all the participants.

## Conflict of Interests

The senior editor 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.

## Declaração sobre as contribuições dos autores

C.F.-P., R.G.T., L.M.R. concetualização e conceção do estudo; R.G.T., S.L., T.F. implementação experimental e recolha de dados; C.F.-P. análise de dados; C.F.- P., R.G.T., L.M.R. redação, edição e revisão; C.F.-P. figuras e gráficos; C.F.-P., R.G.T., L.M.R supervisão; C.F.-P., R.G.T., L.M.R. redação final.

## Financiamento:

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

## Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes.

## Conflito de Interesses

O editor senior envolvido na autoria deste manuscrito não teve qualquer participação no processo de revisão ou decisão. Todos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Kaila, B., & Raman, M. (2008). Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 22(1), 61–68. <https://doi.org/10.1155/2008/609039>.
2. Ratjen, I., Morze, J., Enderle, J., Both, M., Borggreffe, J., Müller, H. P., Kassubek, J., Koch, M., & Lieb, W. (2020). Adherence to a plant-based diet in relation to adipose tissue volumes and liver fat content. *The American journal of clinical nutrition*, 112(2), 354–363. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa119>
3. Kahleova, H., Levin, S., & Barnard, N. (2017). Cardio-Metabolic Benefits of Plant-Based Diets. *Nutrients*, 9(8), 848. <https://doi.org/10.3390/nu9080848>
4. Najjar, R. S., & Feresin, R. G. (2019). Plant-Based Diets in the Reduction of Body Fat: Physiological Effects and Biochemical Insights. *Nutrients*, 11(11), 2712. <https://doi.org/10.3390/nu11112712>
5. Melina, V., Craig, W., & Levin, S. (2016). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116(12), 1970–1980. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.025>
6. Le, L. T., & Sabaté, J. (2014). Beyond meatless, the health effects of vegan diets: findings from the Adventist cohorts. *Nutrients*, 6(6), 2131–2147. <https://doi.org/10.3390/nu6062131>
7. World Medical Association. WMA DECLARATION OF HELSINKI – ETHICAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN SUBJECTS [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 2]. Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
8. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
9. Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>
10. Barnard, N. D., Levin, S. M., & Yokoyama, Y. (2015). A systematic review and meta-analysis of changes in body weight in clinical trials of vegetarian diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(6), 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.11.016>
11. Huang, R. Y., Huang, C. C., Hu, F. B., & Chavarro, J. E. (2016). Vegetarian Diets and Weight Reduction: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of general internal medicine*, 31(1), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11606-015-3390-7>
12. Kuk, J. L., Katzmarzyk, P. T., Nichaman, M. Z., Church, T. S., Blair, S. N., & Ross, R. (2006). Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(2), 336–341. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.43>
13. Tchernof, A., & Després, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*, 93(1), 359–404. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>
14. Ibrahim M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
15. Abate, N., & Chandalia, M. (2012). Role of subcutaneous adipose tissue in metabolic complications of obesity. *Metabolic syndrome and related disorders*, 10(5), 319–320. <https://doi.org/10.1089/met.2012.1502>
16. Fischer, K., Pick, J. A., Moewes, D., & Nöthlings, U. (2015). Qualitative aspects of diet affecting visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue: a systematic review of observational and controlled intervention studies. *Nutrition reviews*, 73(4), 191–215. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu006>
17. Kahleova, H., Petersen, K. F., Shulman, G. I., Alwarith, J., Rembert, E., Tura, A., Hill, M., Holubkov, R., & Barnard, N. D. (2020). Effect of a Low-Fat Vegan Diet on Body Weight, Insulin Sensitivity, Postprandial Metabolism, and Intramyocellular and Hepatocellular Lipid Levels in Overweight Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA network open*, 3(11), e2025454. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.25454/>
18. Shuster, A., Atlas, M., Pinthus, J. H., & Mourtzakis, M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *The British journal of radiology*, 85(1009), 1–10. <https://doi.org/10.1259/bjr/38447238>

## Antioxidant activities and antidiabetic potential of extract of fruits from the *Myrtaceae* family: inhibitory effects on $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase activities

*Atividade antioxidante e potencial antidiabético de extratos de frutos da família Myrtaceae: efeito inibitório na atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase*

Simone Muniz Pacheco <sup>1</sup>, Mauricio Seifert <sup>2</sup>, Rafael de Almeida Schiavon <sup>3</sup>, Maiara Sandrielly Pereira Soares <sup>1</sup>,  
Rejane Giacomelli Tavares <sup>1,4\*</sup>, Mauricio Seifert <sup>2</sup>, Leonardo Nora <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos- CCQFA- Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S / N, Capão do Leão - RS, 96160-000, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Agroindustrial e Tecnologia- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel- Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S / N, Capão do Leão - RS, 96160-000, Brasil; <sup>3</sup>Centro de Ciências da Agricultura, Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Maringá, Av Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil; <sup>4</sup>CBIOS/ ECTS-Universidade Lusófona, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

\*corresponding author: rejane.tavares@ulusofona.pt

### Abstract

There is a great diversity of plants which are grown in the Atlantic Forest region of Brazil that produce small, colorful, edible fruit that are used in empiric mode to treat several diseases, such as diabetes, as fruits are a rich source of dietary phenolic antioxidants. In this study, we investigated the inhibitory activity of methanolic fruit extracts from the *Myrtaceae* family -*Psidium cattleianum* (araçá), *Syzygium cumini* (jambolão), *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Eugenia uniflora* (pitanga) and *Eugenia pyriformis* (uvaia) - against  $\alpha$ -amylase and intestinal  $\alpha$ -glucosidase (maltose and sucrose). The antioxidant activities were evaluated using two different *in vitro* assays: the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) test and the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test. The extracts of *P. cattleianum*, *S. cumini*, *E. pyriformis* inhibited  $\alpha$ -amylase activity between 13% and 60% ( $p < 0.05$ ). The extracts of *P. cattleianum* also inhibited  $\alpha$ -glucosidase activity with either maltose or sucrose as substrate between 15% and 61% ( $p < 0.05$ ). Additionally, these fruits are rich in phenolic compounds with antioxidant activities.

**Keywords:** *Myrtaceae*, diabetes, phenolics,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase

### Resumo

Existe uma grande diversidade de plantas que produzem pequenos frutos comestíveis na região da Mata Atlântica do Brasil e que são utilizados, de modo empírico, para tratar várias doenças, como diabetes, devido aos frutos coloridos serem fonte de antioxidantes fenólicos na dieta alimentar. Neste estudo investigamos a atividade inibitória de extratos metanólicos de frutos da família *Myrtaceae*: *Psidium cattleianum* (araçá), *Syzygium cumini* (jambolão), *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Eugenia pyriformis* (uvaia) na inibição da atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase intestinal (maltose e sacarose). A atividade antioxidante foi determinada em dois diferentes ensaios *in vitro*: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS) e 2,2'-difênil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os extratos de *P. cattleianum*, *S. cumini*, *E. pyriformis* inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase entre 13% e 60% ( $P < 0,05$ ). O extrato de *P. cattleianum* inibiu a atividade da  $\alpha$ -glicosidase (substrato maltose ou sacarose) entre 15% e 61% ( $P < 0,05$ ). Além disso, esses frutos são ricos em compostos fenólicos com atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** *Myrtaceae*, diabetes, fenólicos,  $\alpha$ -glicosidase,  $\alpha$ -amilase

## Introduction

Chronic hyperglycemia due to carbohydrate metabolism alterations is the main characteristic of type 2 diabetes *mellitus* (T2DM). This disease frequently does not present many symptoms and thus can remain undiagnosed and untreated for many years, leading to micro- and macrovascular damage to the eyes, kidneys, heart, and nerves (1). Recommendations to prevent or to delay the complications of this disease include a healthy diet, regular physical exercise, and corporal weight control (lifestyle change) (2).

Several drugs are indicated to treat T2DM, including glucosidase inhibitors such as acarbose, miglitol, and voglibose (3). These drugs act through the interruption or slowing of the digestion of dietary starch in order to decrease the rate of blood sugar absorption in the small intestine by the inhibition of the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes (4,5). Although blood glucose is reduced, the glucosidase inhibitors may generate some unexpected adverse effects, such as diarrhea, abdominal pain, flatulence (3), and weight gain (6).

Consumption of fruits rich in phenolic compounds is associated with health benefits, and there is evidence that some fruit extracts inhibit enzymes involved in carbohydrate metabolism. Thus, fruit extracts have been shown to be a potential source of antihyperglycemic compounds, capable of slowing down glucose absorption with minimum side effects. The *Myrtaceae* family is one of the world's leading commercial fruit tree families with great potential to be explored economically, with fruits presenting excellent nutritional value. Among the various genera belonging to this family, leaf and fruits extracts from *Psidium cattleianum* (araçá), *Syzygium cumini* (jambolão), *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Eugenia uniflora* (pitanga), and *Eugenia pyriformis* (uvaia) have been investigated in the treatment of diabetes. The fruits are considered sources of phytochemicals such as phenolic compounds, carotenoids, and volatile compounds. Many of these phytochemicals have the capability to act in controlling oxidative stress and protein glycation due to their potential to decrease hyperglycemia and hyperlipidemia by the inhibition of the catalysis of digestive enzymes. They are related to the prevention and management of several chronic and degenerative diseases, including cancer, cardiovascular diseases, obesity, amnesia among other disorders (5,7,8). These genera are common in the Atlantic Forest region in Brazil and are widely used in folk medicine

## Introdução

A hiperglicemia crônica, decorrente de alterações no metabolismo dos carboidratos é a principal característica do diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2). Frequentemente esta doença não apresenta muitos sintomas e pode permanecer muitos anos sem diagnóstico e tratamento, levando a vários danos micro- e macrovasculares nos olhos, rins, coração e nervos (1). As recomendações para prevenir a doença ou retardar as complicações incluem uma dieta saudável, exercícios físicos regulares e controle do peso corporal (mudança de estilo de vida) (2).

Vários medicamentos são indicados para tratar DMT2, tais como inibidores de glicosidase (por exemplo, acarbose, miglitol e voglibose) (3). Estes medicamentos atuam interrompendo ou retardando a digestão do amido, diminuindo a taxa de glicose no sangue, proveniente da absorção através do intestino delgado. Este processo é mediado pela inibição da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (4,5). Apesar da redução da glicemia, os inibidores da glicosidase podem gerar efeitos adversos, tais como diarréia, dor abdominal, flatulência (3) e ganho de peso (6).

O consumo de frutos ricos em compostos fenólicos está associado a benefícios à saúde e existem evidências de que alguns extratos de frutos inibem as enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, evidenciando uma fonte potencial de compostos anti-hiperglicêmicos, capazes de retardar a absorção da glicose com o mínimo de efeitos colaterais (5,7,8). A família *Myrtaceae* é uma das principais famílias de árvores frutíferas comerciais do mundo com grande potencial para ser explorada economicamente, cujos frutos apresentam excelente valor nutricional. Entre os vários gêneros pertencentes a esta família foram investigados no tratamento de DMT2 os extratos de folhas e frutos de *Psidium cattleianum* (araçá), *Syzygium cumini* (jambolão), *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Eugenia pyriformis* (uvaia). Os frutos são considerados fontes de fitoquímicos como compostos fenólicos, carotenóides e compostos voláteis. Muitos desses fitoquímicos têm a capacidade de agir controlando o estresse oxidativo e a glicação proteica devido ao seu potencial de diminuir a hiperglicemia e a hiperlipidemia, pela inibição da catálise das enzimas digestivas. Eles estão relacionados à prevenção e ao manejo de várias doenças crônicas e degenerativas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, obesidade, amnésia entre outros distúrbios (5,7,8). Estes gêneros são comuns na região da Mata Atlântica no Brasil e são

to treat hyperglycemia, but without scientific evidence to support the effectiveness of treatment. Therefore, the aim of this study was to characterize fruits from plants of *Myrtaceae* family (*Psidium cattleianum*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia pyriformis*, *Eugenia uniflora* and *Syzygium cumini*) that grow in the Southern region of the Brazilian Atlantic Forest through determination of inhibitory potential of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, their total phenolic and total flavonoid content, and their antioxidant activity.

## Materials and Methods

### *Analytical reagents and chemicals*

Reagents, solvents, and enzymes were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acarbose was purchased from Bayer (Glucobay® 100) and the glucose assay kit (Glicose GOD) was purchased from Labtest® (Minas Gerais, Brazil).

### *Plant material*

The fully ripe fruit from *Psidium cattleianum* (red fruit, accesses 44 and 87, and yellow fruit, access 'bicudo'), *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia pyriformis* (accesses 3, 4, 11, and 15) and *Eugenia uniflora* (access 156) were harvested from the experimental field at 'Embrapa Clima Temperado', Research Station, in Pelotas, RS, Brazil, (31° 42' S, 52° 24' W, Altitude: 57 m). Each access corresponds to a different germoplasm, identified and registered in the Active Germplasm Bank. The fully ripe fruit from *Syzygium cumini* was harvested from the experimental field at 'Universidade Federal de Pelotas', Capão do Leão, RS, Brazil. Only commonly edible parts were used for the analyses – whole fruit for *P. cattleianum* and *C. xanthocarpa*; peel and pulp for *E. pyriformis*, *E. uniflora* and *S. cumini*. Fruits were selected, processed, freeze-dried and stored at -20°C.

### *Preparation of fruit extracts*

Extract preparation was based on the method of Alothman *et al.* (2009), with modifications. Frozen fruits (200 g) were ground to a fine powder in a ball mill (Marccone MA350, São Paulo, Brazil) with liquid nitrogen and mixed (1:3, weight (w)/volume (v) ratio) with an extraction solvent (methanol:water, 80:20, v/v ratio). Samples were incubated for 3 hours in a water bath with stirring and heating (40°C). Extracts were filtered, dried in a rotatory evaporator at 40°C (La Borota 4000

amplamente utilizados na medicina popular para tratar a hiperglicemia, mas sem evidências científicas que apoiem a eficácia do tratamento. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar frutos de plantas da família *Myrtaceae* (*Psidium cattleianum*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia pyriformis*, *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini*) que crescem na região sul da Mata Atlântica brasileira, através da determinação do potencial inibitório da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, seu conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, bem como a atividade antioxidante.

## Material e Métodos

### *Reagentes analíticos e produtos químicos*

Reagentes, solventes e enzimas foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Acarbose foi obtida comercialmente do fabricante Bayer (Glucobay® 100) e o kit de ensaio de glicose (Glicose GOD) foi comprado da Labtest® (Minas Gerais, Brasil).

### *Material vegetal*

Os frutos totalmente maduros de *Psidium cattleianum* (fruto vermelho, acessos 44 e 87 e fruto amarelo, acesso 'bicudo'), *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia pyriformis* (acessos 3, 4, 11 e 15) e *Eugenia uniflora* (acesso 156) foram colhidos do campo experimental na 'Embrapa Clima Temperado', Estação de Pesquisa, em Pelotas, RS, Brasil, (31° 42' S, 52° 24' W, Altitude: 57 m) sendo cada acesso correspondente a um germoplasma diferente, identificado e registrado no Banco de Germoplasma Ativo. O fruto totalmente maduro de *Syzygium cumini* foi colhido do campo experimental da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil. Para as análises foram utilizadas apenas partes comumente comestíveis - fruta inteira para *P. cattleianum* e *C. xanthocarpa*; casca e polpa para *E. pyriformis*, *E. uniflora* e *S. cumini*. Os frutos foram selecionados, processados, liofilizados e armazenados a -20°C.

### *Preparação dos extratos dos frutos*

Os extratos foram realizados segundo o método de Alothman *et al.* (2009) com modificações. Frutos congelados (200 g) foram moídos em pó fino em um moinho de bolas (Marccone MA350, São Paulo, Brasil) com nitrogênio líquido e misturados (1:3, relação peso (m)/volume (v)) com o solvente de extração

Heidolph, Schawabach, Germany) and freeze-dried (Enterprise Terroni, São Carlos (SP), Brazil). Extracts were prepared in triplicate and dissolved in methanol/water (1:3) to a concentration of 5,0 g.ml<sup>-1</sup> and stored at - 20°C until analysis.

#### *Determination of total phenolic content*

Total phenolics were determined by using the Folin-Ciocalteu method described by Swain and Hillis (10). Results were expressed as milligram of gallic acid equivalents per 100 g fresh weight (mg of GAE/100 g fw).

#### *Determination of total flavonoids content*

The total flavonoid content was measured according to the method described by Zhishen *et al.* (11). Results were expressed as milligram catechin equivalents per 100 g fresh weight (mg of CE/100 g fw).

#### *DPPH and ABTS radical-scavenging assay*

Antioxidant activity was determined using the DPPH radical scavenging method according to Brand-Williams *et al.* (12). The ABTS method was performed according to Re *et al.* (13). Results were expressed as a percentage of inhibition of DPPH or ABTS radical, respectively.

#### *α-amylase inhibition assay*

Inhibitory activity of α-amylase was determined according to Yu *et al.* (14) with modifications. The tests were performed using α-amylase from *Bacillus licheniformis* (40 units/mL), aqueous extracts at different concentrations (0.1; 0.25; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 10.0 mg/mL) and a solution of soluble starch (1%). Acarbose was used as positive control (5 μM) (15). The inhibition (%) was calculated by using the following formula:

$$\text{Percent Inhibition} = \frac{(\text{Control Abs} - \text{Sample Abs})}{(\text{Control Abs})} \times 100$$

(metanol:água, 80:20, relação v/v). As amostras foram incubadas durante 3 horas em um banho de água com agitação e aquecimento (40°C). Os extratos foram filtrados e secos utilizando um evaporador rotatório a 40°C (La Borota 4000 Heidolph, Schawabach, Alemanha) e liofilizados (Enterprise Terroni, São Carlos (SP), Brasil). Os extratos foram preparados em triplicata e dissolvidos em metanol/água (1:3) a uma concentração de 5,0 g.ml<sup>-1</sup> e armazenados a - 20°C até a análise.

#### *Determinação do conteúdo fenólico total*

O conteúdo fenólico total foi determinado utilizando o método Folin-Ciocalteu descrito por Swain e Hillis (10). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico por 100 g de material fresco (peso fresco) (mg de EAG/100 g mf).

#### *Determinação do teor total de flavonoides*

O conteúdo total de flavonoides foi determinado utilizando o método descrito por Zhishen *et al.* (11). Os resultados foram expressos em equivalente de catequina miligrama por 100 g de material fresco (peso fresco) (mg de EC/100 g mf).

#### *Ensaio de DPPH e ABTS para a remoção de radicais*

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o método DPPH, de acordo com Brand-Williams *et al.* (12). O método ABTS foi realizado de acordo com Re *et al.* (13). Os resultados foram expressos como percentagem de inibição do radical DPPH ou ABTS, respectivamente.

#### *Ensaio da inibição da α-amilase*

A atividade inibitória da α-amilase foi determinada de acordo com Yu *et al.* (14) com modificações. Os testes foram realizados utilizando α-amilase de *Bacillus licheniformis* (40 unidades/mL), extratos de frutos em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 mg/mL) e solução de amido solúvel (1%). Acarbose foi utilizada como controle positivo (5 μM) (15). A inibição (%) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição percentual} = \frac{(\text{Abs Controle} - \text{Abs Amostra})}{(\text{Abs Controle})} \times 100$$

### *$\alpha$ -glucosidase inhibition assay*

Intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity was based on the method of Adisakwattana *et al.* (16) with modifications. Intestinal acetone powder from rat (Sigma-Aldrich catalog n° I1630) were used for the enzyme solution and maltose (86 mM) or sucrose (400 mM) solutions as the substrate. Fruits extracts were used in different concentrations (1; 2.5; 5.0; 10.0 mg/mL) in aqueous solution. Acarbose was used as a positive control (5  $\mu$ M) (15). The inhibition (%) was calculated by using the following formula:

$$\text{Percent Inhibition} = \frac{(\text{Control Abs} - \text{Sample Abs})}{(\text{Control Abs})} \times 100$$

### *Statistical analysis*

The results were expressed as mean values and standard error (SE). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's Test with  $p < 0.05$ . The statistical program used was GraphPad Prism® version 5.0 (San Diego, California, USA). All analyses were performed in triplicate.

## **Results and Discussion**

### *Phenolic content and antioxidant capacity*

The total content of phenolic compounds and flavonoids of the fruits analyzed in this study are shown in Table 1. The total phenolic compound content ranged from 181.48 to 541.15 mg of GAE/100 g fw. *S. cumini* had the highest phenolic compound content (541,15 mg of GAE/100 g fw) followed by *C. xanthocarpa* (495,86 mg of GAE/100 g fw) and *P. cattleianum* (all accesses) (range 435,81 to 445,64 mg of GAE/100 g fw). Gajera *et al.* (17) evaluated the phenolic content in methanolic extract of *S. cumini* and describe results similar to those in our study. According the authors, seven phenolic compounds (gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, ellagic acid and quercetin) were identified in higher concentrations in seeds and seeds parts. In the *P. cattleianum*, we observed similar quantitative results as reported by Pereira *et al.* (18). However, discrepant higher values (632.56 to 581.02 mg of GAE/100 g fw) were reported by Medina *et al.*

### *Ensaio da inibição da $\alpha$ -glicosidase*

A medida da inibição da  $\alpha$ -glicosidase intestinal foi baseada no método de Adisakwattana *et al.* (16), com modificações. Foi utilizado pó de acetona intestinal obtida de rato (Sigma-Aldrich catalog n° I1630) como solução enzimática e maltose (86 mM) ou sacarose (400 mM) como substrato. Os extratos de frutos foram utilizados em diferentes concentrações (1; 2,5; 5,0; 10,0 mg/mL) em solução aquosa. Acarbose foi utilizada como controle positivo (5  $\mu$ M) (15). A inibição (%) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição percentual} = \frac{(\text{Abs Controle} - \text{Abs Amostra})}{(\text{Abs Controle})} \times 100$$

### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como valores de média  $\pm$  erro padrão (EP). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey com  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

## **Resultados e Discussão**

### *Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante*

O conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides dos frutos analisados estão descritos na Tabela 1. O conteúdo de compostos fenólicos total variou de 181,48 a 541,15 mg de EGA/100 g mf). A maior concentração de compostos fenólicos foi identificada nos frutos de *S. cumini* (541,15 mg de EGA/100 g mf) seguido por *C. xanthocarpa* (495,86 mg de EGA/100 g mf) e *P. cattleianum* (todos os acessos) (435,81 a 445,64 mg de EAG/100 g mf). Gajera *et al.* (17) avaliaram o conteúdo fenólico em extrato metanólico de *S. cumini* e descreveram resultados similares aos obtidos em nosso estudo. Segundo os autores, sete compostos fenólicos (ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico e quercetina) foram identificados em maiores concentrações nas sementes e partes das sementes. Para *P. cattleianum*, em nosso estudo observamos resultados quantitativos semelhantes aos relatados por Pereira *et al.* (18). Entretanto, valores maiores (632,56 a 581,02 mg de EAG/100 g mf) foram descritos no estudo de Medina *et al.* (19), que avaliaram a composição da polpa em extrato aquoso. Estas diferenças podem ser devidas a



**Table 1** - Total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant capacities of methanolic extracts of fruits from *Myrtaceae* family from the Rio Grande do Sul, Brazil. Data represents the mean of three independent determinations (n=3), performed in triplicate. Values in each column with distinct letters are significantly different ( $*p<0.05$ ) using ANOVA and Tukey's post hoc analysis

**Tabela 1** - Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante de extratos metanólicos de frutos da família *Myrtaceae* do Rio Grande do Sul, Brasil. Dados representam a média de três determinações independentes (n=3), realizadas em triplicatas. Valores descritos na mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem estatisticamente ( $p<0,05$ ) na análise estatística ANOVA seguida de análise post hoc pelo teste de Tukey.

Fruits/ Frutos	Total Phenolics / Fenólicos totais <sup>1</sup>	Total Flavonoids / Flavonoides totais <sup>2</sup>	Antioxidant capacities / Capacidade antioxidante	
			DPPH <sup>3</sup>	ABTS <sup>4</sup>
<i>P. cattleianum</i> access 44	435.81 <sup>b</sup>	82.51 <sup>a</sup>	95.62 <sup>a</sup>	66.12 <sup>a</sup>
<i>P. cattleianum</i> access 87	439.33 <sup>b</sup>	85.37 <sup>a</sup>	93.95 <sup>a</sup>	65.18 <sup>a</sup>
<i>P. cattleianum</i> access bicudo	445.64 <sup>b</sup>	100.07 <sup>a</sup>	94.51 <sup>a</sup>	71.95 <sup>a</sup>
<i>C. xanthocarpa</i>	495.86 <sup>b</sup>	52.61 <sup>b</sup>	95.13 <sup>a</sup>	55.32 <sup>b</sup>
<i>S. cumini</i>	541.15 <sup>a</sup>	86.75 <sup>a</sup>	94.53 <sup>a</sup>	64.14 <sup>a</sup>
<i>E. uniflora</i> access 156	293.48 <sup>c</sup>	12.65 <sup>c</sup>	67.10 <sup>c</sup>	21.78 <sup>c</sup>
<i>E. pyriformis</i> access 3	399.01 <sup>c</sup>	43.67 <sup>b</sup>	87.20 <sup>b</sup>	25.99 <sup>c</sup>
<i>E. pyriformis</i> access 4	181.48 <sup>c</sup>	14.35 <sup>c</sup>	40.78 <sup>d</sup>	18.32 <sup>c</sup>
<i>E. pyriformis</i> access 11	240.25 <sup>c</sup>	20.50 <sup>c</sup>	47.02 <sup>d</sup>	21.37 <sup>c</sup>
<i>E. pyriformis</i> access 15	211.93 <sup>c</sup>	21.84 <sup>c</sup>	41.60 <sup>d</sup>	24.13 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Total phenolics compounds expressed in milligram of gallic acid equivalents per 100 g fresh weight (mg GAE/100g fw) / Compostos fenólicos totais expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por 100 g de material fresco (mg EAG/100 g mf).

<sup>2</sup> Total flavonoids expressed in milligram of catechin equivalents per 100 g fresh weight (mg CE/100g fw) / Flavonoides totais expressos em miligrama de equivalente de catequina por 100 g de material fresco (mg EC/100 g mf).

<sup>3</sup> Expressed in % of inhibition of DPPH radical / Expresso em % de inibição do radical DPPH.

<sup>4</sup> Expressed in % of inhibition of ABTS radical / Expresso em % de inibição do radical ABTS.

(19), who evaluated the composition of pulp in aqueous extracts. These differences can be due to several factors, such as humidity, soil type, climate during the development phase, stage of maturation (20), genetic differences, and postharvest storage conditions (21). The part(s) of the fruit utilized and the method of extraction can also contribute to these differences (18).

In order to determine the antioxidant activity of the extracts, two distinct methods were used (DPPH and ABTS) (Table 1). The highest percentage of inhibition of DPPH radicals were observed in *C. xanthocarpa* (95.13%), *S. cumini* (94.53%) and *P. cattleianum* (all accesses) (93.95% to 95.62%), which correlated with the highest levels of phenolic compounds detected. Similar results were observed in the inhibition of ABTS radicals. Total phenolic content is positively correlated with antioxidant activity. In fact, major phenolic compounds related to fruits from *Myrtaceae* family, such as gallic acid, catechin, ellagic and ferulic acids are strongly linked to antidiabetic and free radical scavenging activity (17). Chelation, inhibition of lipid peroxidation, anti-inflammatory, and antiproliferative properties are also linked to phenolic compounds (18). Other authors have also described the antioxidant property of methanolic extract of *S. cumini* in leaves, fruit peel, and leaf gall, corroborating with our results (22).

#### *Inhibitory activities against $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase*

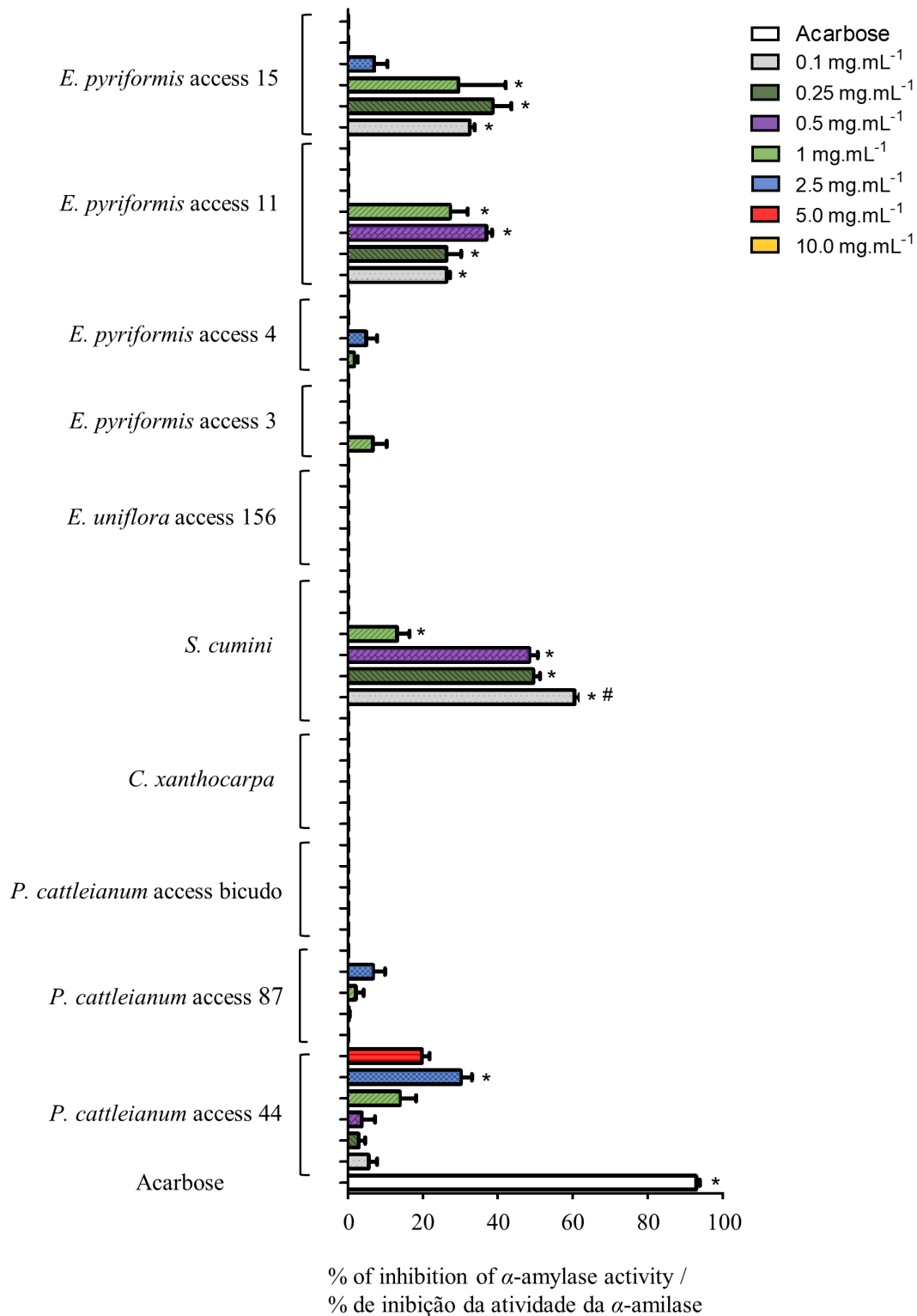
Currently available drugs for the control of hyperglycemia are effective, however, the search for alternatives that will have fewer side effects is of great interest. Therefore, this study assessed fruit extracts for their inhibitory potential in the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase which are directly related to glucose absorption. Extracts of plants that are rich in phenolic compounds have been described as inhibiting both enzymes (5). In our study, *P. cattleianum* access 44 (2.5 mg/mL), *S. cumini* (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/mL) and *E. pyriformis* access 11 (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/mL) and access 15 (0.1, 0.25 and 0.5 mg/mL) extracts significantly inhibited ( $p < 0.05$ )  $\alpha$ -amylase activity *in vitro* (Figure 1). The extract of *S. cumini* demonstrated the highest percentage of  $\alpha$ -amylase activity inhibition ( $60.50 \pm 1.37\%$ ) at lower concentrations (0.1 mg/mL). In an *in vivo* study, rats fed with ethanolic extract of *S. cumini* seed and pulp were observed to have an ameliorated / lower production of insulin and a better blood sugar balance (17). This effect was attributed

vários fatores como umidade, tipo de solo, clima durante a fase de desenvolvimento, estágio de maturação (20), diferenças genéticas e condições de armazenamento pós-colheita (21). Além disso, a parte da fruta utilizada e o método de extração também podem ser responsáveis por estes resultados (18).

Para determinar a atividade antioxidante dos extratos, foram utilizados dois métodos distintos (DPPH e ABTS) (Tabela 1). A maior porcentagem de inibição dos radicais DPPH foi observada para *C. xanthocarpa* (95,13%), *S. cumini* (94,53%) e *P. cattleianum* (todos os acessos) (93,95% a 95,62%), sendo observada a relação da atividade antioxidante naqueles frutos com as maiores concentrações de compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram observados para inibição dos radicais ABTS. O conteúdo fenólico total está positivamente correlacionado com a atividade antioxidante. De fato, os principais compostos fenólicos encontrados nos frutos da família *Myrtaceae*, tais como ácido gálico, catequina, ácido elágico e ácido ferúlico estão altamente relacionados com a atividade antidiabética e antioxidante (17). As propriedades quelantes, inibição da peroxidação lipídica, anti-inflamatórios e antiproliferativos também estão correlacionadas com compostos fenólicos (18). Outros autores também descrevem a propriedade antioxidante do extrato metanólico de *S. cumini* obtido a partir de folhas, casca de frutas e galhas das folhas, corroborando com nossos resultados (22).

#### *Inibição da atividade de $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase*

Os medicamentos atualmente disponíveis para o controle da hiperglicemia são efetivos. Entretanto, a busca de alternativas que tenham menos efeitos colaterais é de grande interesse. Portanto, este estudo avaliou extratos de frutos que apresentem potencial inibitório na atividade da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, enzimas que estão diretamente relacionados à absorção da glicose. Dentre os possíveis frutos a serem utilizados, aqueles ricos em compostos fenólicos são descritos como inibidores de ambas as enzimas (5). Em nosso estudo, extratos de *P. cattleianum* acesso 44 (2,5 mg/mL), *S. cumini* (0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL) e *E. pyriformis* acessos 11 (0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL) e 15 (0,1, 0,25 e 0,5 mg/mL) significativamente inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase *in vitro* ( $p < 0,05$ ) (Figura 1). O extrato de *S. cumini* foi responsável pela maior porcentagem de inibição ( $60,50 \pm 1,37\%$ ) da atividade da  $\alpha$ -amilase em concentrações mais baixas (0,1 mg/mL). Em um estudo *in vivo*, ratos foram tratados com extrato etanólico de *S. cumini*, obtido a partir de semente

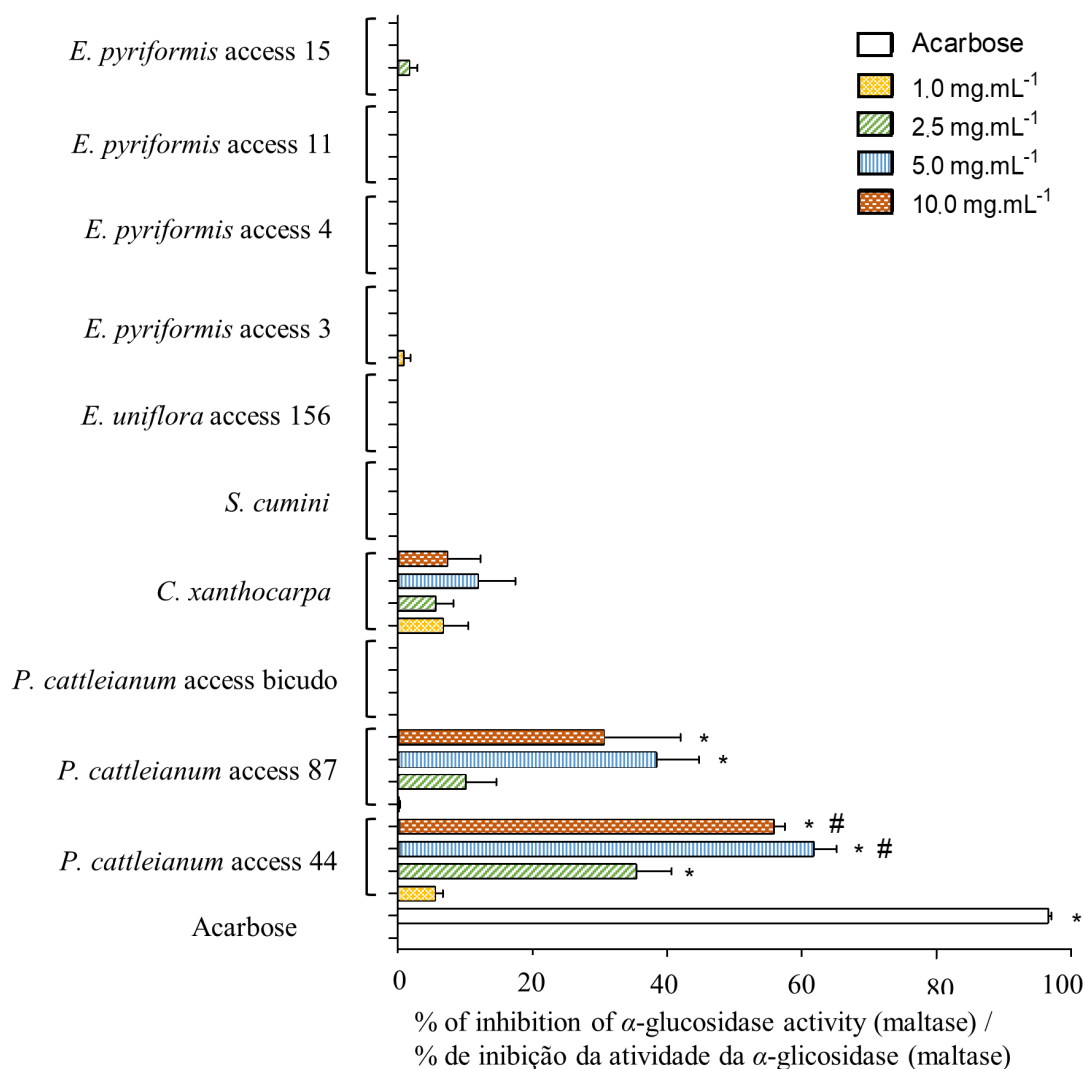


**Figure 1** -  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of fruits from *Myrtaceae* family from the Rio Grande do Sul, Brazil. Data are expressed in % of inhibition in relation of control (n=3). \* Indicates significantly difference ( $*p < 0.05$ ) using ANOVA and Tukey's post hoc analysis in relation of control (0% of inhibition); # Indicates significantly difference ( $*p < 0.05$ ) between different concentrations of the same group

**Figura 1** - Inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase por frutos da família *Myrtaceae* do Rio Grande do Sul, Brasil. Dados são expressos em % de inibição em relação ao controle (n=3). \*Indica diferença significativa ( $*p < 0,05$ ) usando ANOVA e análise post hoc de Tukey, em relação ao controle (0% de inibição); # Indica diferença significativa ( $*p < 0,05$ ) entre diferentes concentrações do mesmo grupo.

to ellagic acid and its ability to stop the conversion of starch into sugar when glucose level increases in blood (17,23). The  $\alpha$ -amylase inhibition is also attributed to catechins. These are able to bind to the active site side chains, resulting in a complex that prevents the substrate from binding (noncompetitive inhibition), and variations in catechin structure can affect their power of inhibition. The addition of a galloyl group, for example, creates a powerful inhibitor inhibition (24). Similarly to our results, Poonguran *et al.* (25) also demonstrate a significantly higher inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase using methanol and water extracts of *S. cumini* leaves, rich in tetriterpenoids ursolic acid and oleanolic acid.

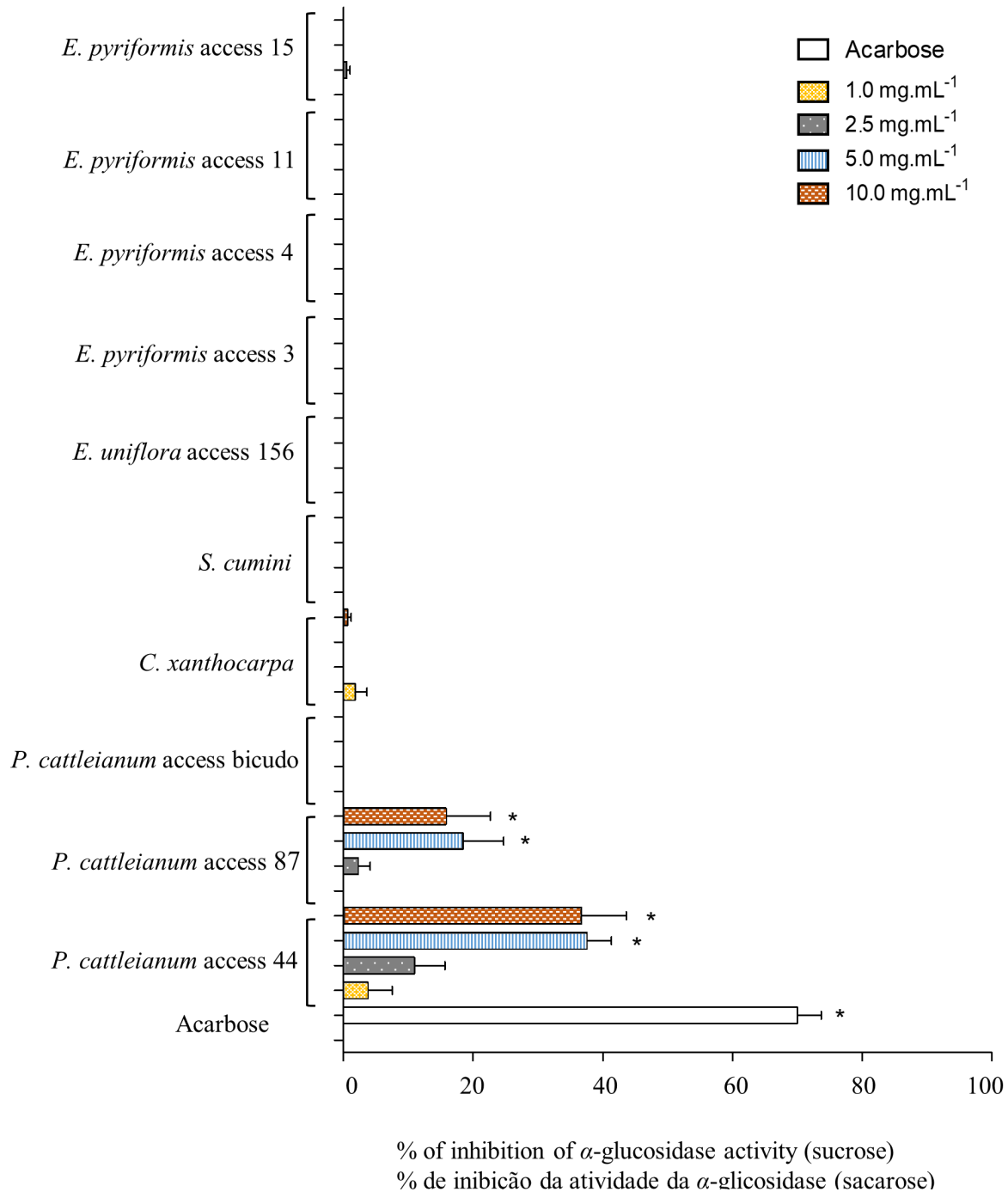
e polpa, onde foi observada uma melhora na produção de insulina e do balanço de glicose no sangue (17). Este efeito foi atribuído ao ácido elágico e sua capacidade de modular a conversão de amido em açúcar quando o nível de glicose no sangue aumenta (17, 23). A inibição da  $\alpha$ -amilase também pode ser atribuída às catequinas. Estas são capazes de se ligar às cadeias laterais do sítio ativo, resultando em um complexo que impede a ligação do substrato (inibição não competitiva). A variação na estrutura da catequina pode afetar seu poder de inibição. Ao adicionar o grupo galoil o composto formado é capaz de exercer uma poderosa inibição (24). Semelhante aos nossos resultados, Poonguran *et al.* (25)



**Figure 2** -  $\alpha$ -glucosidase/maltase inhibitory activities of fruits from *Myrtaceae* family from the Rio Grande do Sul, Brazil (maltose substrate). Data are expressed in % of inhibition in relation of control (n=3)\* Indicates significantly difference ( $*p<0.05$ ) using ANOVA and Tukey's post hoc analysis in relation of control (0% of inhibition); # Indicates significantly difference ( $*p<0.05$ ) between different concentrations of the same group.

**Figura 2** - Inibição da atividade de  $\alpha$ -glicosidase/maltase por frutos da família *Myrtaceae* do Rio Grande do Sul, Brasil (substrato maltose). Dados são expressos em % de inibição em relação ao controle (n=3)

\*Indica diferença significativa ( $*p < 0,05$ ) usando ANOVA e análise post hoc de Tukey, em relação ao controle (0% de inibição); # Indica diferença significativa ( $*p < 0,05$ ) entre diferentes concentrações do mesmo grupo.



**Figure 3** -  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of fruits from *Myrtaceae* family from the Rio Grande do Sul, Brazil (sucrose substrate). Data are expressed in % of inhibition in relation of control (n=3). \* Indicates significantly difference (\* $p$ <0.05) using ANOVA and Tukey's post hoc analysis in relation of control (0% of inhibition); # Indicates significantly difference (\* $p$ <0.05) between different concentrations of the same group.

**Figura 3** - Inibição da atividade de  $\alpha$ -glicosidase por frutos da família *Myrtaceae* do Rio Grande do Sul, Brasil (substrato sacarose). Dados são expressos em % de inibição em relação ao controle (n=3). \*Indica diferença significativa (\* $p$  <0,05) usando ANOVA e análise post hoc de Tukey, em relação ao controle (0% de inibição); # Indica diferença significativa (\*  $p$  <0,05) entre diferentes concentrações do mesmo grupo.

Phenolic compounds were found to be effective inhibitors of intestinal  $\alpha$ -glucosidase/maltase activity. Phenolic compounds positively interact with enzymes by changing their biocatalytic action. The carboxyl and hydroxyl groups of phenolic acids bind to the starch through hydrogen bonds, chelation or covalent bonds, forming bridges or cross-links (23).  $\alpha$ -Glucosidase activity was evaluated using maltose and sucrose substrates. *P. cattleianum* access 44 (2.5, 5.0 and 10.0 mg/ml) and access 87 (5.0 and 10.0 mg/ml) were capable of significantly inhibiting maltase activity ( $p < 0.05$ ) (Figure 2). When we used sucrose as substrate, *P. cattleianum* access 44 (5.0 and 10.0 mg/ml) and access 87 (5.0 and 10.0 mg/ml) were able to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). Interestingly, the inhibitory effects were observed in the presence of the highest flavonoids contents. In a study with red fruits of *P. cattleianum*, several anthocyanins (cyanidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, and cyanidin chloride) were identified as majority compounds (26). Flavonoids myricetin and quercetin, found in *Hovenia Dulcis Thunb.*, have been reported to reversibly inhibit  $\alpha$ -glucosidase in a noncompetitive manner (8). It should also be noted that enzymes of different origin showed different results. When assessing inhibition of yeast  $\alpha$ -glucosidase, cyanidin (99%), myricetin (94%) and genistein (93%) were the main inhibitors. When using  $\alpha$ -glucosidase from rat small bowel, the main inhibitors were epigallocatechin gallate (32%), myricetin (29%), and quercetin (28%) (27). Moreover, other authors have reported the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity might be due to the present of ellagitannins, such as punicalin and punicalagin (28).

Extracts from yellow *P. cattleianum* access 'bicudo', *E. uniflora*, and *E. pyriformis* accesses 3 and 4 did not significantly inhibit  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -glucosidase activity in our study. However the concentration of total content of phenolic compounds and flavonoids reported are similar in red and yellow fruits of *P. cattleianum*, previous studies demonstrate that yellow fruits are rich in carotenoids (18) and red fruits has high content of anthocyanins (20), that may contribute to explain specific biological activities observed in our study. Pinto *et al.* (21) and Podsędek *et al.* (4) report that inhibition of the activity of both enzymes seems not to depend on the total phenolic compound content but the characteristics of the individual compounds such as concentration, structure, and interaction between them. These characteristics can contribute to the stability, solubility, and binding ability of these compounds to target enzymes (4).

demonstram um efeito inibitório significativamente maior na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase utilizando extratos metanólicos e aquosos de folhas de *S. cumini*, ricos em dois triterpenóides, ácido ursólico e ácido oleanólico.

Os compostos fenólicos são descritos como inibidores eficazes da atividade intestinal  $\alpha$ -glicosidase/maltase. Estes interagem positivamente com as enzimas, alterando sua ação biocatalítica. Os grupos carboxil e hidroxil dos ácidos fenólicos ligam-se ao amido através de ligações de hidrogênio, quelação ou ligações covalentes, formando pontes ou ligações cruzadas (23). A atividade da  $\alpha$ -glicosidase foi avaliada tendo como substratos maltose e sacarose. *P. cattleianum* acesso 44 (2,5, 5,0 e 10,0 mg/ml) e acesso 87 (5,0 e 10,0 mg/ml) inibiram significativamente a atividade da maltase ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Para o substrato sacarose, *P. cattleianum* acesso 44 (5,0 e 10,0 mg/ml) e acesso 87 (5,0 e 10,0 mg/ml) também inibiram a atividade da  $\alpha$ -glicosidase ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Curiosamente, estes efeitos inibidores foram observados na presença dos mais altos conteúdos de flavonoides. Em um estudo com frutos vermelhos de *P. cattleianum* foi identificada a presença de antocianinas (cianidina-3-glicosídeo, malvidina-3-g glicosídeo e cloreto de cianidina) como compostos majoritários (26). Também os flavonoides miricetina e quercetina encontrados em *Hovenia Dulcis Thunb.*, foram descritos como inibidores reversíveis de  $\alpha$ -glicosidase, de forma não competitiva (8). Além disso, enzimas de diferentes origens apresentaram resultados diferentes. Ao se avaliar a inibição da  $\alpha$ -glicosidase de levedura, a cianidina (99%), a miricetina (94%) e a genisteína (93%) foram os principais inibidores. Quando se utilizou  $\alpha$ -glicosidase de intestino de ratos, os principais inibidores foram a epigallocatequina galato (32%), a miricetina (29%) e a quercetina (28%) (27). Outros autores também relataram que a atividade inibitória  $\alpha$ -glicosidase pode ser devida à presença de elagitaninas, como a punicalina e a punicalagina (28).

Os extratos de *P. cattleianum* amarelo acesso 'bicudo', *E. uniflora*, *E. pyriformis* acessos 3 e 4 não inibiram significativamente a atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase em nosso estudo. Embora a concentração do conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides relatados sejam semelhantes nos frutos vermelhos e amarelos de *P. cattleianum*, estudos anteriores demonstram que os frutos amarelos são ricos em carotenóides (18) e os frutos vermelhos possuem alto teor de antocianinas (20), que pode contribuir para explicar atividades biológicas específicas observadas em nosso estudo. Pinto *et al.* (21) e Podsędek *et al.* (4)

## Conclusion

Extracts of *P. cattleianum* (accesses 44 and 87), *S. cumini* and *E. pyriformis* (accesses 11 and 15) evaluated in this study were effective in inhibiting the activity of  $\alpha$ -amylase and/or  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*, correlated with high content of phenolic compounds and antioxidant capacity. Considering the evidence which suggests that phenolic compounds are relevant in the prevention or treatment of chronic diseases, including T2DM, increasing knowledge on the biological activities of native fruits rich in this compounds could be useful for developing functional foods focus on health benefits.

## Authors Contributions Statement

SMN, MS, and MSP prepared the extracts and performed enzymatic assays. RAS performed phytochemical analysis, RGT and LN performed the conceptualization and study design, SMN wrote the manuscript, RGT ensured statistical analysis, supervision, and final writing /correction of the manuscript.

## Funding

This study was supported by CNPq.

## Acknowledgements

We are grateful to Rodrigo Cezar Franzon and to the Embrapa Clima Temperado for the supply of fruits.

## Conflict of Interests

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

relatam que a inibição da atividade de ambas as enzimas parece não depender do conteúdo total dos compostos fenólicos e sim das características dos compostos individuais, como concentração, estrutura e interação entre eles. Estas características podem contribuir para a estabilidade, solubilidade e a capacidade de ligação destes compostos com as enzimas alvo (4).

## Conclusões

Extratos de *P. cattleianum* (acessos 44 e 87), *S. cumini* e *E. pyriformis* (acessos 11 e 15) avaliados neste estudo foram eficazes na inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase e / ou  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*, correlacionado com alto teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Considerando as evidências que sugerem que os compostos fenólicos são relevantes na prevenção ou tratamento de doenças crônicas, incluindo o DMT2, aumentar o conhecimento das atividades biológicas de frutas nativas ricas nesses compostos pode ser útil para o desenvolvimento de alimentos funcionais com foco em benefícios à saúde.

## Declaração sobre as contribuições do autores

SMN, MS, e MSP prepararam os extratos e realizaram ensaios enzimáticos. RAS realizou a análise fitoquímica, RGT e LN realizaram a conceituação e delineamento do estudo, SMN redigiu o manuscrito, RGT realizou a análise estatística, supervisão e redação final / correção do manuscrito.

## Financiamento

Este estudo foi financiado pelo CNPq.

## Agradecimentos

Agradecemos a Rodrigo Cezar Franzon e à Embrapa Clima Temperado pelo fornecimento dos frutos.

## Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver relações financeiras e / ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses. Satil teropublium acipse, mo Castum ta nonimur. Quod dem inprid parbit.

## References / Referências

1. Broholm, S.L., Gramsbergen, S.M., Nyberg, T., Jäger, A.K., Staerk, D. (2019) Potential of *Sorbus* berry extracts for management of type 2 diabetes: Metabolomics investigation of H NMR spectra,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, and *in vivo* anti-hyperglycaemic activity of *S. norvegica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 242, 112061. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112061>
2. Xiao, J. (2015) Natural polyphenols and diabetes: understanding their mechanism of action. *Current Medical Chemistry*, 22(1): 2-3. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141012173816>
3. Hedrington, M.S. & Davis, S.N. (2019) Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 20 (18): 2229-2235. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1672660>
4. Podsedek, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., Koziolkiewicz, M. (2014). *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20): 4610-4617. <https://doi.org/10.1021/jf5008264>
5. Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M.C., Brunton, N., Gibney, E.R., Lyng, J. (2021) Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chemistry*, 338 (2021) 128119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128119>
6. Carpené, C., Gomez-Zorita, S., Deleruyelle, S., Carpené, M. A. (2015) Novel strategies for preventing diabetes and obesity complications with natural polyphenols. *Current Medical Chemistry*, 22(1): 150-164. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140815124052>
7. Correia, R. T., Borges, K. C., Medeiros, M. F., Genovese, M. I. (2012) Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18(6): 539-547. <https://doi.org/10.1177/1082013211433077>
8. Sun, L. & Miao, M. (2019) Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544883>
9. Alothman, M., Bhat, R., Karim, A. A. (2009) Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extract with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3): 785-788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
10. Swain, T., Hillis, W. E. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. – The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1): 63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
11. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555-559.
12. Brand-Wiliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
13. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
14. Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., Chen, F. (2011) Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, 129(4): 1376-1382.
15. Jockovic, N., Fischer, W., Brandsch, M., Brandt, W., Dräger, B. (2013) Inhibition of human intestinal  $\alpha$ -glucosidases by calystegines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23): 5550-5557. <https://doi.org/10.1021/jf4010737>
16. Adisakwattana, S., Ruengsamran, T., Kampa, P., Sompong, W. (2012). *In vitro* inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 12: 110. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-110>.
17. Gajera, H.P., Getiya, S.N., Hirpara, D.G., Patel, S.V., Golakiya, B.A. (2017) Antidiabetic and antioxidant functionality associated with phenolic constituents from fruit parts of indigenous black jamun (*Syzygium cumini* L.) landraces. *Journal of Food Science and Technology*, 54(10): 3180-3191. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2756-8>
18. Pereira, E.S., Vinholes, J., Franzon, R.C., Dalmazo, G., Vizzotto, M., Nora, L. (2018). *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry*, 258:95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.024>
19. Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., Silva, W. P., Nora, L., Rombaldi, C. V. (2011) Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128(4): 916-922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>
20. Biegelmeier, R., Andrade, J. M. M., Aboy, A. L., Apel, M. A., Dresch, R. R., Marin, R., Raseira, M. C. B., Henriques, A. T. (2011) Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. *Journal of Food Science*, 76(7): 991C-996C. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x>
21. Pinto, M. S., Kwon, Y., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., Shetty, K. (2010) Evaluation of red currants (*Ribes rubrum* L.), black currants (*Ribes nigrum* L.), red and green gooseberries (*Ribes uva-crispa*) for potential management of type 2 diabetes and hypertension using *in vitro* models. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3): 639-660.
22. Franco, R.R., Zabisky, L.F.R., Lima Júnior, J.P., Alves, V.H.M., Justino, A.B., Saraiva, A.L., Goulart, L.R., Espindola, F.S. (2020) Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: A non-hemolytic plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 261: 113132. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113132>
23. Chhikara, N., Kaur, R., Jaglan, S., Sharma, P., Gat, Y., Panghal, A. (2018) Bioactive compounds and pharmacological and food applications of *Syzygium cumini* – a review. *Food and Function*, 9: 6096-6115. <https://doi.org/10.1039/c8fo00654g>
24. Miao, M., Jiang, H., Jiang, B., Li, Y., Cui, S. W., Zhang, T. (2014) Structure elucidation of catechins for modulation of starch digestion. *LWT – Food Science and Technology*, 57(1): 188-193.
25. Poonguran, J., Perera, H.K.I., Jayasinghe, L., Fernando, I.T., Sivakanesan, R., Araya, H., Fujimoto, Y. (2017) Bioassay-guided fractionation and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1): 206-211. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1257031>
26. Nora, C. D., Jablonski, A., Rios, A. O., Hertz, P. F., Jong, E. V., Flôres, S. H. (2014) The characterization and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). *International Journal of Food Science & Technology*, 49: 1842-1849. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12493>
27. Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006) Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2): 149-153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>
28. Vinhole, J., Reis, S.F., Lemos, G., Barbieri, R.L., Freitas, V., Franzon, R.C., Vizzotto, M. (2018) Effect of *in vitro* digestion on the functional properties of *Psidium cattleianum* Sabine (araçá), *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick (butiá) and *Eugenia uniflora* L. (pitanga) fruit extracts. *Food & Function*, 9: 6380-6390. <https://doi.org/10.1039/c8fo01329b>



## Topically applied methyl nicotinate evokes a temporary inflammation on human skin

*Metilnicotinato aplicado topicamente evoca uma inflamação temporária na pele humana*

Sérgio Faloni de Andrade\*, Clemente Rocha, Luis Monteiro Rodrigues

Universidade Lusófona - CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

\*corresponding author: sergio.andrade@ulusofona.pt

---

### Abstract

Some challengers such as methyl nicotinate (MN) have been used in human models to study the anti-inflammatory effect of topical formulations. However, MN skin responses are still poorly understood and widely varied. In the present study we aim to contribute to better characterise those responses. Eight healthy participants were selected. All procedures were approved by the institutional Ethics Committee. Two aqueous MN dilutions (0.5% and 1.0%) were left in contact for 1 minute in the anterior forearm skin. Following exposure, skin reactions were clinically and biometrically assessed at 30, 60 and 120 minutes and compared with baseline. Measurements involved the ICDRG clinical score scale and select analytical technologies - laser Doppler flowmetry, Polarised Spectroscopy, Transepidermal Water Loss Meter, and High Resolution Sonography. Results have shown that MN application evoked a maximal response at 30 minutes with an increase in the ICDRG score between 1-2. Significant changes in TEWL and microcirculation were observed, as was an increased dermal hypoeogenicity (edema), detected by HRS. These effects are compatible with a localised short-duration inflammation and reinforce the interest of MN to be used as a safe and controllable challenger in human models.

**Keywords:** Methyl Nicotinate, *in vivo* human skin, microcirculation, TEWL, inflammation

---

### Resumo

Algumas substâncias, como o metilnicotinato (MN), têm sido usados em experimentos de provocação na pele humana para estudar o efeito anti-inflamatório de formulações tópicas. No entanto, as respostas da pele ao MN ainda são pouco conhecidas e amplamente variadas. No presente estudo pretendemos contribuir para melhor caracterizar essas respostas. Oito participantes saudáveis foram selecionados. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética institucional. Duas diluições aquosas de MN (0,5% e 1,0%) foram colocadas em contacto com a pele do antebraço por 1 minuto. Após a exposição, as reações cutâneas foram avaliadas clínica e biometricamente nos tempos 30, 60 e 120 minutos e comparadas com a linha de base. As medições envolveram a escala de pontuação clínica do ICDRG e outras tecnologias - fluxometria por laser Doppler, espectroscopia polarizada, medida da perda de água transepidermica (PTEA) e Ultra-Sonografia de Alta Resolução (USAR). Os resultados mostraram que a aplicação de MN evocou uma resposta máxima após 30 minutos, com um aumento no escore ICDRG entre 1-2. Também provocou mudanças significativas na PTEA, microcirculação e um aumento da hipoeogenicidade dérmica (edema) detectado por USAR. Esses efeitos são compatíveis com uma inflamação localizada de curta duração e reforçam a utilidade do MN para usado como um desafiador seguro e controlável em modelos humanos.

**Palavras-chave:** Metilnicotinato, pele humana *in vivo*, microcirculação, Perda Transepidermica de água, inflamação

## Introduction

Inflammation is a key feature in clinical dermatology, with an enormous variety of factors and mechanisms affecting skin inflammatory processes and their clinical expression in terms of signs and subjective symptoms. These complicated interactions between skin and the immune system and skin and the nervous system, sometimes referred to as the neuro-immuno-cutaneous (NIC) system are probably a major component of this reality still far from being fully understood (1-3). From the therapeutic point of view this is a remarkable target for pharma and skin care industries since inflammatory disorders are present during the whole human lifecycle, from the newborn to the elderly (4-6). Market demand is growing widely, such that “over-the-counter” medicines and cosmetics are among the consumers’ preference all over the world, reflecting also easy access and product satisfaction (7,8).

The systematic investment in the safety evaluation of dermatological products before market introduction partially explains this success. In the post-animal-ban testing era, many new approaches for skin irritation testing and risk assessment were proposed *in vitro*, primarily in human (9,10). Several challengers were progressively developed to assess, again in human, the effectiveness of anti-inflammatory formulations, such as the anionic detergent sodium lauryl sulfate (SLS), benzoic acid, sorbic acid, methyl nicotinate (MN). Some mechanical approaches (friction, abrasive grains, tape-stripping) have also been proposed and used as irritants (11,12). A remarkable amount of experimental information accumulated around SLS and MN have led these compounds to be regarded as safe and capable of reproducing a controlled “inflammation-like” state useful for safety and efficacy assessments of many topical products (12-15). However, data shows that SLS is a strong skin irritant which deforms cell membrane proteins, especially when applied under occlusion (0.5% dilutions and higher), provoking an intense, clinically variable, and lasting aggression to the skin not without risk or/and discomfort. (16-18). In turn, MN is a nicotinic acid derivative whose vasodilator capacity seems to be of multifactorial origin (19,20). MN, as benzoic acid, sorbic acid, and nicotinic acid derivatives, is able to provoke nonimmunologic contact urticaria

## Introdução

A inflamação é uma característica chave em dermatologia clínica, apesar de existir uma enorme variedade de fatores e mecanismos que afetam os processos inflamatórios da pele e sua expressão clínica em termos de sinais e sintomas subjetivos. Estas interações complexas entre a pele e o sistema imunológico e a pele e o sistema nervoso, às vezes referidas como sistema neuro-imuno-cutâneo (NIC) são provavelmente uma componente importante de uma realidade ainda longe de ser totalmente compreendida (1-3). Do ponto de vista terapêutico, este é um alvo notável para as indústrias farmacêutica e de cuidados com a pele, pois os distúrbios inflamatórios estão literalmente presentes durante todo o ciclo de vida humana, desde o indivíduo recém-nascido até o idoso (4-6). De fato, este é um amplo mercado de demanda crescente onde os medicamentos e cosméticos “de venda livre” estão entre as preferências dos consumidores em todo o mundo, reflexo também do fácil acesso e satisfação de uso (7,8).

O investimento sistemático na avaliação de segurança dos produtos dermatológicos antes da introdução no mercado explica parcialmente este sucesso. Na era pós-proibição de testes em animais, muitas novas abordagens para testes de irritação da pele e avaliação de risco foram propostas *in vitro*, mas principalmente em humanos (9,10). Várias substâncias desafiadoras foram progressivamente desenvolvidas para avaliar, em humanos, a eficácia de formulações anti-inflamatórias como o detergente aniônico sulfato de sódio laurílico (SLS), ácido benzóico, ácido sórbico, metilnicotinato (MN). Algumas abordagens mecânicas (fricção, grãos abrasivos, fitas adesivas) também têm sido propostas e utilizadas como irritantes (11,12). Nesse contexto, há uma quantidade notável de informações experimentais acumuladas em torno de SLS e MN as quais são consideradas seguras e capazes de produzir uma “inflamação” controlada, útil para a avaliação da segurança e eficácia de produtos de uso tópico (12-15). Entretanto, os dados mostram que o SLS é um forte irritante que causa deformação das proteínas da membrana celular, especialmente quando aplicado sob oclusão (diluições de 0,5% e superiores), provocando uma intensa agressão à pele, clinicamente variável e duradoura com riscos e/ou desconforto associados. (16-18). Por sua vez, o MN é um derivado do ácido nicotínico cuja capacidade vasodilatadora parece ser de origem multifatorial (19,20). O MN, assim como o ácido benzóico, ácido sórbico e derivados do ácido nicotínico, é capaz de provocar urticária de contato

(NICU), the most common form of immediate contact reaction resulting in a rapid inflammatory response without the requirement of previous sensitization. Both challengers (SLS and MN) have also been long questioned for reproducibility (11). Their mechanisms of action and factors that condition individual reactions have not been completely identified (20-23).

Nevertheless, these models have added an enormous amount of valuable scientific knowledge for physiological-pharmacological and toxicological research, even if still far from being complete. In the present study, we try to look further into the action mechanisms of MN in human *in vivo* skin using different non-invasive technologies.

## Materials and Methods

### *Participants*

Eight healthy individuals, both sexes (three men and five women), ages between 20 and 59 years old (mean  $41.37 \pm 11.32$  years old) were selected according to previously defined inclusion/non-inclusion criteria, namely (i) no visible cutaneous lesions and no past or present record of dermatological disease or atopy, (ii) no application of any cosmetics in the test area 48 hours prior to the study at baseline, and (iii) absence of any pharmacological treatment that might interfere with measurements. All procedures observed the principles of good clinical practice of the Helsinki Declaration and respective amendments (24) and included informed written consent. The study was previously approved by the institutional Ethical Committee.

### *Experimental*

Two aqueous MN dilutions of 0.5% or 1.0% were randomly applied (in the form of soaked 5 mm diameter paper discs) in pre-defined areas ( $1\text{cm}^2$ ) of the anterior aspect of the forearm with no occlusion. The dilutions remained in contact with the skin for 1 minute before removal. A similar empty area in the same forearm was used as a negative control. Skin functional variables were measured by non-invasive technologies at time 0 (control) and after MN contact at 30, 60, and 120 minutes.

não imunológica (UCNI), que consiste na forma mais comum de reação de contato imediato, resultando em uma resposta inflamatória rápida que não requer uma sensibilização prévia. Ambos os testes também têm sido questionados há muito tempo por sua reprodutibilidade (11), o que também significa que seus mecanismos de ação não são completamente entendidos (20-23).

No entanto, estes modelos permitiram acrescentar uma enorme quantidade de conhecimentos científicos valiosos para pesquisas fisiológico-farmacológicas e toxicológicas ainda longe de serem concluídas. No presente estudo, tentamos aprofundar o conhecimento dos mecanismos de ação MN na pele humana *in vivo*, utilizando diferentes tecnologias não-invasivas.

## Materiais e Métodos

### *Participantes*

Oito indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (três homens e cinco mulheres), com idades entre 20 e 59 anos (média  $41,37 \pm 11,32$  anos) foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão/não inclusão previamente definidos, nomeadamente: (i) sem lesões cutâneas visíveis e nenhum registo passado ou presente de doença dermatológica ou atopia, (ii) nenhuma aplicação de qualquer cosmético na área de teste 48 horas antes do início do estudo, e (iii) ausência de qualquer tratamento farmacológico que possa interferir com as medições. Todos os procedimentos seguiram os princípios de boa prática clínica da Declaração de Helsinquia e respectivas emendas (24) e incluiu um consentimento informado escrito. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

### *Experimental*

Duas soluções aquosas de MN (0,5% ou 1,0%) foram aplicadas aleatoriamente (imersão em um disco de papel de 5 mm de diâmetro) em áreas pré-definidas ( $1\text{cm}^2$ ) da face anterior de um dos antebraços sem oclusão. A diluição foi deixada em contato com a pele durante 1 minuto antes da remoção. Uma área semelhante mas sem aplicação de MN no mesmo antebraço foi usada como controlo negativo. As variáveis funcionais da pele foram medidas por tecnologias não invasivas no tempo 0 (controlo) e após o contato com MN nos tempos 30, 60 e 120 minutos.

Analytical technologies for the evaluation of the effects of exposure were:

- Polarized Spectroscopy using the Tissue Viability Imaging system (TiVi 700, WheelsBridge AB, Linköping, Sweden), which quantifies the concentration of red blood cells (CRBC - TiVi index), expressed in arbitrary units, in a previously selected region of interest (ROI);
- Laser Doppler Flowmetry (LDF, PeriFlux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Sweden), which measures the perfusion expressed in arbitrary units of perfusion (PUs);
- Transepidermal Water Loss Meter, a direct indicator of “epidermal barrier” integrity, measured by evaporimetry (Tewameter TM300, CK electronics, Köln, Germany) and expressed as g/hour/m<sup>2</sup>.
- High-resolution sonography (HRS) (Dermascan C, Cortex Technology, Hadsund, Denmark) providing a bidimensional color image recorded at a velocity of 1580 m/s, using a 20MHz probe placed on the skin in a fixed standard position (25). The color image was converted into a greyscale image for further analysis and processed by software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Skin responses were also scored by direct observation using the International Contact Dermatitis Group Research (ICDRG) scale (26) adapted by Yulla et al., (3) (Table 1).

All measurements took place in a controlled humidity and temperature environment (humidity ~50%, temperature 21 ± 2 °C) where participants were allowed to acclimatize for a minimum of 30 minutes prior to evaluations.

**Table 1** - ICDRG criteria for assessing skin sensitization potential provoked by different chemical agents (adapted from Yulla et al., 2019)

**Tabela 1** - Critérios do ICDRG para avaliar o potencial de sensibilização da pele provocada por diferentes agentes químicos (adaptado de Yulla et al., 2019)

Criterion / Critério	ICDRG	Notation Score / Notação de Score
No reaction / Não reativo	0	0
Doubtful reaction / Reação duvidosa	±	0.5
Erythema and edema / Eritema e edema	+	1
Erythema, oedema, and vesicles / Eritema, edema, e vesículas	++	2
Severe reaction with blisters / Reação severa com bolhas	+++	3

As tecnologias escolhidas foram

- Espectroscopia polarizada usando o sistema de imagem de viabilidade tecidual (TiVi 700, WheelsBridge AB, Linköping, Suécia) que quantifica a concentração de hemácias (CRBC - índice TiVi), expressa em unidades arbitrárias, em uma região de interesse previamente selecionada (ROI);
- Fluxometria por laser Doppler (LDF, PeriFlux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Suécia), que mede a perfusão expressa em unidades arbitrárias de perfusão (PU's);
- Medidor de Perda de Água Transepidérmico, um indicador direto da integridade da “barreira epidérmica”, medido por evaporimetria (Tewameter TM300, CK Electronics, Köln, Alemanha) e expresso em g/hora/m<sup>2</sup>.
- Ultra-sonografia de alta resolução (USAR) (Dermascan C, Cortex Technology, Hadsund, Dinamarca) que forneceu uma imagem colorida bidimensional gravada a uma velocidade de 1580 m/s, usando uma sonda de 20 MHz colocada na pele em uma posição padrão fixa (25). A imagem colorida foi convertida em uma imagem em escala de cinza para posterior análise e processamento pelo software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

As respostas cutâneas também foram pontuadas por observação direta usando a escala International Contact Dermatitis Group Research (ICDRG) (26) adaptada por Yulla et al., (3) (Tabela 1).

Todas as medições ocorreram em ambiente com umidade e temperatura controladas (umidade ~ 50%, temperatura 21 + 2 °C) onde os participantes puderam se aclimatar por pelo menos 30 minutos antes das avaliações.

### Statistics

Data reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) were compared by the Wilcoxon signed-rank test using GraphPadPrism 5<sup>®</sup> software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant in all experiments.

### Results and Discussion

The clinical evaluation with the ICDRG score scale revealed that both MN dilutions significantly increased the score after 30 minutes ( $1.5 \pm 0.19$  and  $1.37 \pm 0.18$  for 0.5% and 1.0%, respectively). The reaction was visually much more intense at 30 minutes, decreasing almost to the baseline after 60 and 120 minutes (Figure 1).

The TEWL increase suggests that MN disturbed the epidermal skin barrier function (Figure 2) while high-resolution sonography (HRS) revealed an increased dermal hypoechogenicity which is suggestive of edema formation (Figures 3 and 4). The skin barrier changes were expected and have been previously reported (27). However, the presence of edema, confirming

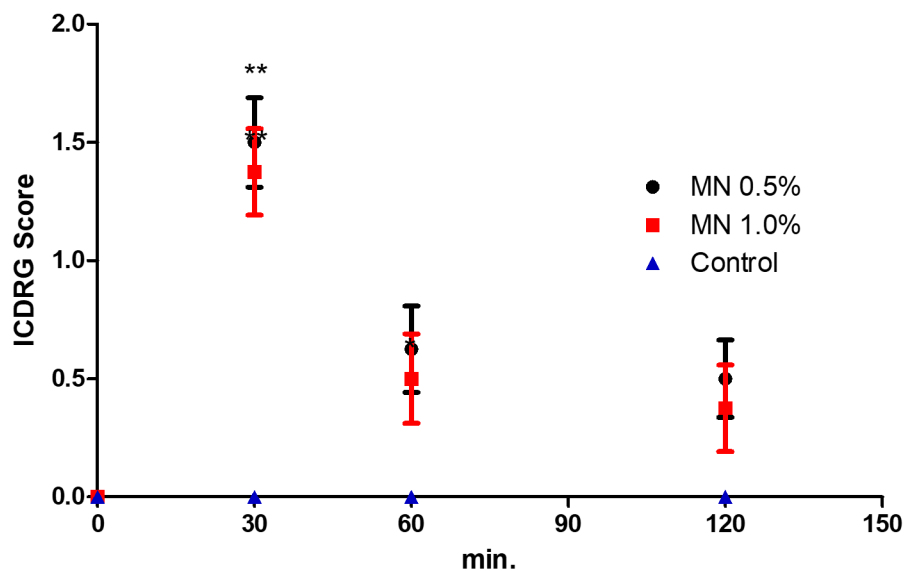
### Estatística

Os dados foram reportados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A comparação foi feita pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon usando o software GraphPadPrism5<sup>®</sup> (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo em todos os experimentos.

### Resultados e Discussão

A avaliação com a escala de pontuação do ICDRG revelou que ambas as diluições de MN aumentaram significativamente a pontuação após 30 minutos ( $1,5 \pm 0,19$  e  $1,37 \pm 0,18$  para 0,5% e 1,0%, respectivamente). Visualmente, a reação foi muito mais intensa em 30 minutos, diminuindo quase até a linha de base após 60 e 120 minutos (Figura 1).

O aumento da PTEA sugere que o MN perturbou a função de barreira cutânea epidérmica (Figura 2), enquanto a ultrassonografia de alta resolução (USAR) revelou um aumento da hipoechogenicidade dérmica que é sugestiva de formação de edema (Figuras 3 e 4). As alterações da barreira cutânea eram esperadas e já foram relatadas anteriormente (27). No entanto, a presença



**Figure 1** - Effects of MN 0.5% and 1.0% on ICDRG score at the different times of measurement. Statistical comparison was performed using Wilcoxon signed-rank test.  $**p < 0.01$  when compared to the control site.

**Figura 1** - Efeitos de MN 0,5% e 1,0% no score ICDRG nos diferentes tempos de medição. A comparação estatística foi realizada usando o teste não paramétrico de Wilcoxon.  $**p < 0,01$  quando comparado ao controlo negativo.

a cardinal sign of inflammation, as detected by HRS images, have not been previously described under the present experimental conditions. Consistent skin microcirculatory changes were also detected by both LDF and TIVI systems (Figures 5 and 6).

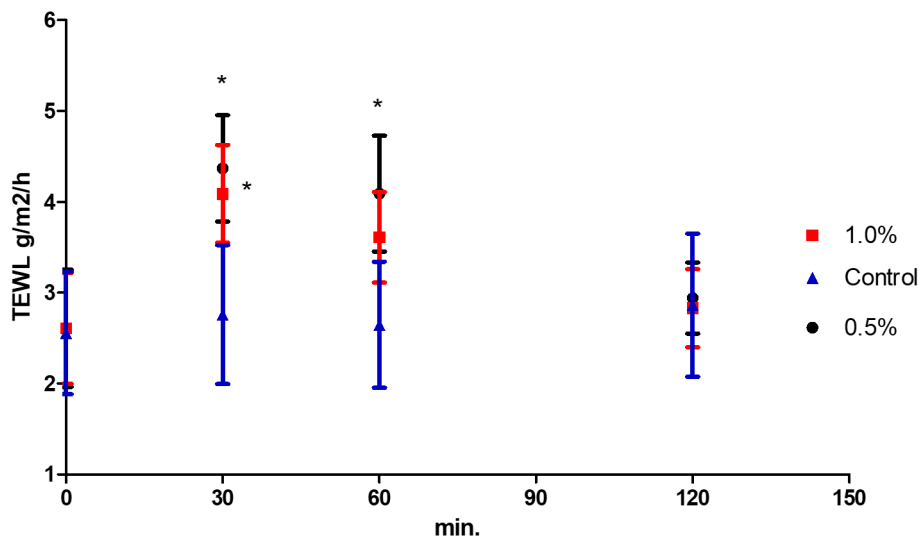
Skin irritation and inflammation are common components of the dermatology glossary used to describe responses to a wide variety of chemical, physical, or biological stimuli. Often its significance is not very clear, being conversely used in distinct clinical processes. Skin barrier disruption, induction of a cytokine cascade, and involvement of oxidative stress are the main pathological alterations observed after cutaneous aggression resulting in a visible or subclinical inflammatory reaction (12,28). Additionally, a strong interindividual variability response to irritants is recognised, but when there is sufficient exposure and high concentrations of the irritant, all individuals are prone to develop this cutaneous reaction (12,28,29).

Our approach suggests that MN application evokes a consistent change of all the skin, from the epidermal barrier to the dermal plexus. This vasodilation is known, described as painless, short-term, and reproducible when evaluated in the same person using the same dose and application site (30). However, the peak response for this vasodilation and, all other parameters as well, occurred at 30 minutes after MN application and, although not

de edema, confirmando um sinal cardinal principal de inflamação, detectado pelas imagens de HRS, não foi descrita antes, nas condições experimentais atuais. Foram observadas também alterações consistentes da microcirculação da pele detectadas pelos sistemas LDF e TIVI (Figuras 5 e 6).

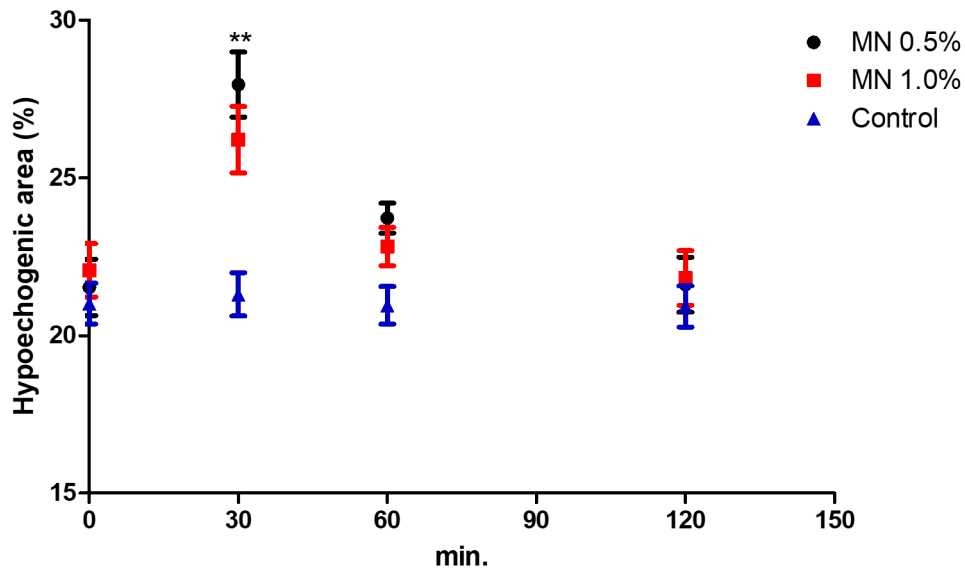
A irritação e a inflamação da pele são componentes comuns do glossário dermatológico usado para descrever as respostas a uma ampla variedade de estímulos químicos, físicos ou biológicos. Frequentemente, seu significado não é tão claro, sendo usados inversamente em processos clínicos distintos. Ruptura da barreira cutânea, indução de cascata de citocinas e envolvimento do stresse oxidativo são as principais alterações patológicas observadas após agressão cutânea resultando em reação inflamatória visível ou subclínica (12,28). Além disso, uma grande variabilidade de resposta interindividual aos irritantes é conhecida, mas quando há exposição suficiente e alta concentração do irritante, todos estão propensos a desenvolver essa reação cutânea (12,28,29).

Nossa abordagem sugere que a aplicação de MN evoca uma mudança consistente de toda a pele, desde a barreira epidérmica ao plexo dérmico. Essa vasodilatação é conhecida, descrita como indolor, de curta duração e reproduzível quando avaliada na mesma pessoa na mesma dose e local de aplicação (30). No entanto, o



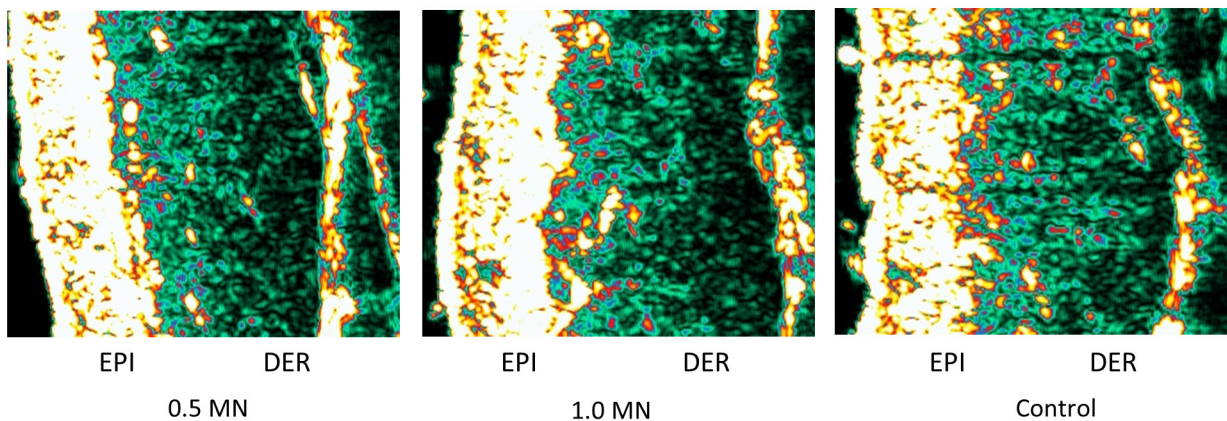
**Figure 2** - Effects of MN 0.5% and 1.0% on Transepidermal water loss (TEWL) at the different times of measurement. Statistical comparison was performed using Wilcoxon signed-rank test. \* $p < 0.05$  when compared to the control site.

**Figura 2** - Efeitos do MN 0,5% e 1,0% na perda transepidérmica de água (PTEA) nos diferentes tempos de medição. A comparação estatística foi realizada usando o teste não-paramétrico de Wilcoxon. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controlo negativo.



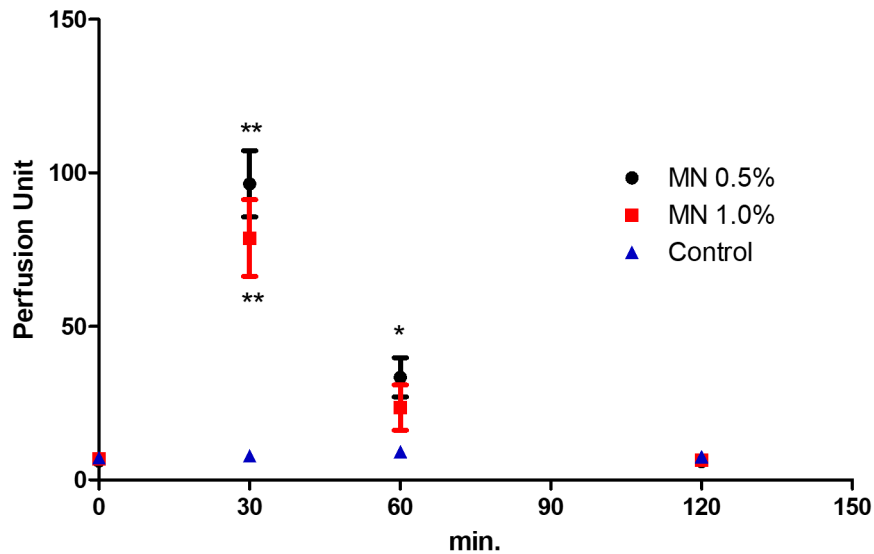
**Figure 3** - Effects of MN 0.5% and 1.0% on skin hypoechoicity at the different times of measurement. Statistical comparison was performed using Wilcoxon signed-rank test.  $**p < 0.01$  when compared to the control site.

**Figura 3** - Efeitos do MN 0,5% e 1,0% na hipoecogenicidade da pele nos diferentes tempos de medição. A comparação estatística foi realizada usando o não-paramétrico de Wilcoxon.  $**p < 0,01$  quando comparado ao controlo negativo.



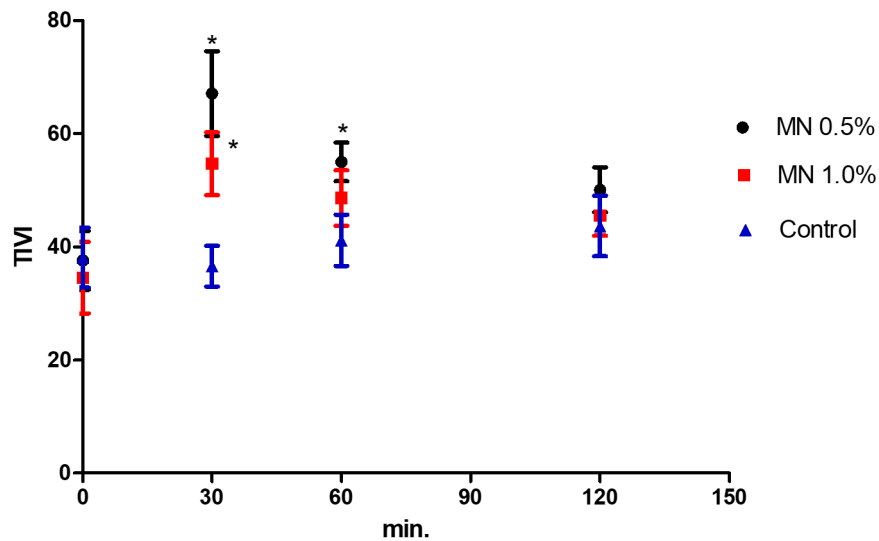
**Figure 4** - Illustrative example of the impact of application of MN solution 0.5% and 1.0% on the sonographic structure of one volunteers' skin. Images obtained by HRS 30 minutes after the application, shows an increase of the hypoechoicity. EPI= epidermal layer; DERM= dermis.

**Figura 4** - Exemplo ilustrativo do impacto da aplicação de solução MN 0,5% e 1,0% na estrutura ultrassonográfica da pele de um voluntário. Imagens obtidas pelo USAR 30 minutos após a aplicação, mostram aumento da hipoecogenicidade. EPI = camada epidérmica; DERM = derme.



**Figure 5** - Effects of MN 0.5% and 1.0% on skin microcirculation at the different times of measurement. Register was done with Laser Doppler Flowmetry (LDF). Statistical comparison was performed using Wilcoxon signed-rank test.  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  when compared to the control site.

**Figura 5** - Efeitos do MN 0,5% e 1,0% na microcirculação da pele nos diferentes tempos de medição. O registo foi feito com Fluxometria por Laser Doppler (LDF). A comparação estatística foi realizada usando o teste não-paramétrico de Wilcoxon.  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  quando comparado ao controlo negativo.



**Figure 6** - Effects of MN 0.5% and 1.0% on skin microcirculation at the different times of measurement. Register was done with Polarized Light (TIVI device) Statistical comparison was performed using Wilcoxon signed-rank test.  $*p < 0.05$  when compared to the control site.

**Figura 6** - Efeitos do MN 0,5% e 1,0% na microcirculação da pele nos diferentes tempos de medição. O registo foi feito com Espectroscopia polarizada usando o sistema de imagem de viabilidade tecidual (dispositivo TIVI). A comparação estatística foi realizada usando o teste não-paramétrico de Wilcoxon.  $*p < 0,05$  quando comparado ao controlo negativo.



significant, we noticed a trend for the highest response at the lowest concentration (MN 0.5% solution). These results are inline with similar observations (31,32) but the opposite has also been described (11). The presence of a localised edema, only detected by the HRS, suggests a short duration inflammatory process that might be mediated by prostaglandins with neurogenic components since histamine and nitric oxide might not be involved in this process (15,31).

## Conclusion

Our results contribute to a better understanding of the impact of MN on human skin and its interest as an experimental challenger. Even in low concentrations, MN is capable of modifying the entire cutaneous structure for a short period of time. This seems to be particularly suitable for safety and efficacy studies involving the anti-inflammatory activity. Nevertheless, more studies are needed to better understand and control MN mechanisms of action.

## Authors Contributions Statement

LMR and SFA conceptual design; SFA and CR experimental and data analysis; SFA and LMR drafted and wrote the manuscript in its final version.

## Acknowledgements

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

## Conflict of Interests

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

pico de resposta para essa vasodilatação e, também, para todos os outros parâmetros, ocorreu 30 minutos após a aplicação do MN e, embora não significativa, notamos uma tendência para a maior resposta na concentração mais baixa (solução MN 0,5%). Esses resultados estão em linha com observações semelhantes (31,32), mas o oposto também foi descrito (11). A presença de edema localizado, detectado apenas pelo USAR, sugere um processo inflamatório de curta duração que pode ser mediado por prostaglandinas com componentes neurogênicos, uma vez que a histamina e o óxido nítrico parecem não estar envolvidos neste processo (15,31).

## Conclusão

Nossos resultados contribuem para entender melhor o impacto do MN na pele humana e seu interesse como um desafiante experimental. Mesmo em pequenas concentrações, o MN é capaz de modificar toda a estrutura cutânea por um curto período de tempo. Isso parece ser particularmente adequado para estudos de segurança e eficácia envolvendo a atividade antiinflamatória. No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender e controlar os mecanismos de ação do MN.

## Declaração de contribuições dos autores

LMR e SFA planejaram os experimentos; SFA e CR fizeram a coleta e análise dos dados; SFA e LMR redigiram e escreveram o manuscrito em sua versão final.

## Agradecimentos

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

## Conflito de interesses

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

## References / Referências

1. Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390-401.
2. Hänel, K., Cornelissen, C., Lüscher, B., & Baron, J. (2013). Cytokines and the Skin Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6720-6745. doi: 10.3390/ijms14046720
3. Vidal Yucha, S., Tamamoto, K., & Kaplan, D. (2019). The importance of the neuro-immuno-cutaneous system on human skin equivalent design. *Cell Proliferation*, 52(6), e12677. doi: 10.1111/cpr.12677
4. Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., & Valesini, G. (2011). Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(7), 369-374. doi: 10.1016/j.autrev.2010.12.006
5. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. doi: 10.1038/nature07201
6. de Almeida Roediger, M., de Fátima Nunes Marucci, M., Duim, E., Santos, J., de Oliveira Duarte, Y., & de Oliveira, C. (2019). Inflammation and quality of life in later life: findings from the health, well-being and aging study (SABE). *Health And Quality Of Life Outcomes*, 17(1), 26. doi: 10.1186/s12955-019-1092-2
7. Milam, E., & Rieder, E. (2021). An Approach to Cosmeceuticals. *Essential Psychiatry For The Aesthetic Practitioner*, 42-48.
8. Tetali, B., Fahs, F., & Mehregan, D. (2019). Popular over-the-counter cosmeceutical ingredients and their clinical efficacy. *International Journal Of Dermatology*, 59(4), 393-405. doi: 10.1111/ijd.14718
9. Hoffmann, S., Kleinstreuer, N., Alépée, N., Allen, D., Api, A., & Ashikaga, T. et al. (2018). Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Critical Reviews In Toxicology*, 48(5), 344-358. doi: 10.1080/10408444.2018.1429385
10. Robinson, M., Cohen, C., de Fraissinette, A., Ponec, M., Whittle, E., & Fentem, J. (2002). Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food And Chemical Toxicology*, 40(5), 573-592. doi: 10.1016/s0278-6915(02)00005-4
11. Jumbelic, L., Liebel, F., & Southall, M. (2006). Establishing a Minimal Erythema Concentration of Methyl Nicotinate for Optimum Evaluation of Anti-Inflammatories. *Skin Pharmacology And Physiology*, 19(3), 147-152. doi: 10.1159/000092595
12. Fluhr, J., Akengin, A., Bornkessel, A., Fuchs, S., Praessler, J., & Norgauer, J. et al. (2005). Additive impairment of the barrier function by mechanical irritation, occlusion and sodium lauryl sulphate in vivo. *British Journal Of Dermatology*, 153(1), 125-131. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06430.x
13. Tupker, R., Willis, C., Berardksca, E., Lee, C., Fartasch, M., Atinrat, T., & Serup, J. (1997). Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. *Contact Dermatitis*, 37(2), 53-69. doi: 10.1111/j.1600-0536.1997.tb00041.x
14. Tadić, V., Arsić, I., Zvezdanović, J., Zugić, A., Cvetković, D., & Pavkov, S. (2017). The estimation of the traditionally used yarrow ( *Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. *Journal Of Ethnopharmacology*, 199, 138-148. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.002
15. Elawa, S., Mirdell, R., Farnebo, S., & Tesselaar, E. (2019). Skin blood flow response to topically applied methyl nicotinate: Possible mechanisms. *Skin Research And Technology*, 26(3), 343-348. doi: 10.1111/srt.12807
16. Lee, C., Kim, H., Han, H., & Park, C. (2004). A Comparison Study of Nonanoic Acid and Sodium Lauryl Sulfate in Skin Irritation. *Exogenous Dermatology*, 3(1), 19-25. doi: 10.1159/000084139
17. Gabard, B., Chatelain, E., Bieli, E., & Haas, S. (2001). Surfactant irritation: in vitro corneofluorescence and in vivo bioengineering. *Skin Research And Technology*, 7(1), 49-55. doi: 10.1034/j.1600-0846.2001.007001049.x
18. Pinto, PC., Martinho, H., & Rodrigues L.M. (2007) Studying the influence of the phototype over human skin's response to Sodium Lauryl Sulfate contact *in vivo*, *Revista Saúde & Tecnologia*, (4)1, 47-56.
19. Morrow, J., Parsons, W., & Roberts, L. (1989). Release of markedly increased quantities of prostaglandin D2 in humans following the administration of nicotinic acid. *Prostaglandins*, 38(2), 263-274. doi: 10.1016/0090-6980(89)90088-9
20. Guy, R., & Maibach, H. (1982). Rapid radial transport of methyl nicotinate in the dermis. *Archives Of Dermatological Research*, 273(1-2), 91-95. doi: 10.1007/BF00509031
21. Guy, R., Tur, E., Bjerke, S., & Maibach, H. (1985). Are there age and racial differences to methyl nicotinate—induced vasodilatation in human skin? *Journal Of The American Academy Of Dermatology*, 12(6), 1001-1006. doi: 10.1016/s0190-9622(85)70128-4
22. Leoty-Okombi, S., Gillaizeau, F., Leuillet, S., Douillard, B., Le Fresne-Languille, S., & Carton, T. et al. (2021). Effect of Sodium Lauryl Sulfate (SLS) Applied as a Patch on Human Skin Physiology and Its Microbiota. *Cosmetics*, 8(1), 6. doi: 10.3390/cosmetics8010006
23. De Jongh, C., Verberk, M., Withagen, C., Jacobs, J., Rustemeyer, T., & Kezic, S. (2006). Stratum corneum cytokines and skin irritation response to sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis*, 54(6), 325-333. doi: 10.1111/j.0105-1873.2006.00848.x
24. World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191. doi: 10.1001/jama.2013.281053
25. Seidenari, S., Nakijo, A., Pepe, P., & Giannetti, A. (1991). Ultrasound B scanning with image analysis for assessment of allergic patch test reactions. *Contact Dermatitis*, 24(3), 216-222. doi: 10.1111/j.1600-0536.1991.tb01701.x
26. Marzulli, F., & Maibach, H. (1976). Contact allergy: Predictive testing in man. *Contact Dermatitis*, 2(1), 1-17. doi: 10.1111/j.1600-0536.1976.tb02972.x
27. Ratz-lyko, A., Arct, J., & Pytkowska, K. (2016). Moisturizing and antiinflammatory properties of cosmetic formulations containing *Centella asiatica* extract. *Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 27. doi: 10.4103/0250-474x.180247
28. Fluhr, J., Darlenski, R., Angelova-Fischer, I., Tsankov, N., & Basketter, D. (2008). Skin Irritation and Sensitization: Mechanisms and New Approaches for Risk Assessment. *Skin Pharmacology And Physiology*, 21(3), 124-135. doi: 10.1159/000135635
29. Sasseville, D. (2008). Occupational Contact Dermatitis. *Allergy, Asthma, And Clinical Immunology*, 4(2), 59-65. doi: 10.1186/1710-1492-4-2-59
30. Poelman, M., Piot, B., Guyon, F., Deroni, M., & Leveque, J. (1989). Assessment of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 41(10), 720-722. doi: 10.1111/j.2042-7158.1989.tb06350.x
31. Vertuani, S., Ziosi, P., Solaroli, N., Buzzoni, V., Carli, M., & Lucchi, E. et al. (2003). Determination of antioxidant efficacy of cosmetic formulations by non-invasive measurements. *Skin Research And Technology*, 9(3), 245-253. doi: 10.1034/j.1600-0846.2003.00018.x

## Systemic treatment of HER2-positive breast cancer patients with brain metastases: current status and exploratory case study in a Portuguese cohort

*Tratamento sistémico do carcinoma de mama HER2 positivo com metástases cerebrais: estado atual e estudo exploratório de casos numa coorte portuguesa*

Paulo Luz <sup>1,2\*</sup>, Elsa Campoa <sup>1</sup>, Rita Gameiro <sup>3</sup>, Marta Vaz <sup>4</sup>, Isabel Fernandes <sup>3</sup>, Joana Magalhães <sup>1</sup>, Beatriz Gosalbez <sup>1</sup>, Sofia Braga <sup>4</sup>, João Guilherme Costa <sup>2</sup>, Ana Sofia Fernandes <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Hospitalar Universitário do Algarve, Medical Oncology;

<sup>2</sup>CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Centro Hospitalar Barreiro-Montijo, Medical Oncology

<sup>4</sup>Hospital Fernando Fonseca EPE, Medical Oncology

\*corresponding author: p\_luz@msn.com

### Abstract

Over the last years, the incidence of brain metastases in HER2 breast cancer patients has increased. Surgery and radiotherapy are the current standard local therapies. Nevertheless, it is unclear which and when systemic treatment should be applied in addition to local treatment. This work aims to present an updated review of current systemic treatment options for patients with HER2+ metastatic breast cancer with brain metastases and to present a case study of clinical cases that occurred in a Portuguese population. The methodology of this work included a literature search in PubMed for the impact of HER2-targeting agents, such as pertuzumab, trastuzumab emtansine (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab deruxtecan, and tucatinib in the treatment of patients with HER2+ breast cancer with brain metastases. Then, a cohort of Portuguese patients with HER2+ breast cancer (n=44) was analyzed. In this exploratory study, considering a follow-up of 23.9 months, three patients (6.8%) developed brain metastases despite having shown a complete pathological response. The role of systemic treatment for patients with HER2 breast cancer with brain metastases has rapidly evolved following recent successes in phase II and III clinical trials. The biggest challenge is how to integrate systemic and local treatment in the management of these patients.

**Keywords:** Brain metastases, breast cancer, HER2, trastuzumab deruxtecan, tucatinib

### Resumo

Nos últimos anos, a incidência de metástases cerebrais em doentes com cancro da mama HER2 tem aumentado. A cirurgia e a radioterapia continuam a ser os tratamentos preferenciais. No entanto, não é claro que tratamento sistémico, para além do tratamento local, deve ser aplicado e quando. Este trabalho visa apresentar uma revisão das atuais opções de tratamento sistémico nos doentes com cancro da mama metastático HER2+ com metástases cerebrais e apresentar casos clínicos ocorridos numa amostra da população portuguesa. A metodologia deste trabalho incluiu uma pesquisa bibliográfica no PubMed sobre o impacto de agentes anti-HER2, tais como pertuzumab, trastuzumab-emtansina (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab-deruxtecan, e tucatinib no tratamento de doentes com cancro da mama HER2+ com metástases cerebrais. Seguidamente, foi também analisada uma coorte de doentes portugueses com cancro da mama HER2+ (n=44). Neste estudo exploratório, considerando um seguimento médio de 23,9 meses, três pacientes (6,8%) desenvolveram metástases cerebrais, apesar de terem apresentado resposta patológica completa. O papel do tratamento sistémico em doentes com cancro da mama HER2 com metástases cerebrais evoluiu rapidamente, após os recentes sucessos em ensaios clínicos de fase II e III. O maior desafio é o de integrar o tratamento sistémico e local na gestão destes doentes.

**Palavras-chave:** metástases cerebrais, cancro da mama, HER2, trastuzumab deruxtecan, tucatinib

## Introduction

Up to 15% of all patients with metastatic breast cancer (BC) will develop brain metastases during the course of their disease. The molecular subtypes with a higher risk of developing brain metastases are triple-negative breast cancer and HER2+ tumors (1). The incidence of brain metastases has been rising over the last years, commonly attributed to the excellent systemic control that increases the overall survival (OS) of BC patients. According to several studies, the presence of brain metastases in HER2+ BC occurs in about 10-14% after diagnosis of early-stage disease and 28-41% in metastatic settings (1, 2).

In terms of survival, a retrospective study carried out at Institut Jules Bordet, Belgium, with 483 patients, 72 of which had brain metastasis, revealed an overall survival (OS) of 20.8 months, compared with 46.7 months of OS in the group of patients with metastatic disease without disease in the brain (1). Over the years, therapeutic developments, namely anti-HER2 therapies, have changed the paradigm associated with this tumor subtype and its OS. With these developments, there was an increase in OS from 2-16 months to 14-24 months (3).

For treating brain metastasis, surgical intervention is preferable whenever possible, namely in single lesions with small size and easy surgical access (3), although radiotherapy is also an option. In randomized trials that included patients with lung and breast cancer, the median survival in patients treated with whole-brain radiotherapy (WBRT) ranges from four to six months, at the cost of some relevant toxicity, namely cognitive impairment (4-6). The development of stereotactic techniques has also significantly improved the quality of life of these patients, associated with less neurological toxicity (1-3). With the advent of multiple therapies, the paradigm has changed. New systemic approaches have been shown to increase patient survival and the maintenance of functionality in daily activities (1,3).

This article aims to review the different systemic therapies currently available for the treatment of HER2+ BC patients with brain metastases (BM). Moreover, a cohort of Portuguese patients with HER2+ breast cancer was analyzed and a case study of the patients that developed BM is presented.

## Introdução

Até 15% de todas as doentes com cancro da mama (CM) metastático, desenvolverão metástases cerebrais durante o curso da doença. Os subtipos moleculares com maior risco de desenvolver metástases cerebrais são o CM triplo-negativo e os tumores HER2+ (1). A incidência de metástases cerebrais tem vindo a crescer nos últimos anos, em parte devido ao excelente controlo sistémico que aumenta a sobrevivência global (SG) deste doentes. De acordo com vários estudos, o cancro de mama HER2+ representa 20 a 25% de todos os subtipos sendo que a presença de metástases cerebrais ocorre em cerca de 10-14% após o diagnóstico em estadios precoce, e 28-41% em contexto metastático (1,2).

Em termos de sobrevivência, um estudo retrospectivo realizado no Institut Jules Bordet, na Bélgica, com 483 pacientes, 72 dos quais com metástases cerebrais, mostrou uma SG de 20,8 meses, em comparação com 46,7 meses no grupo de pacientes com doença metastática sem doença a nível cerebral (1). Ao longo dos anos, o desenvolvimento de novas terapêuticas, nomeadamente moléculas anti-HER2, alteraram o paradigma associado a este subtipo e à sua SG. Com estes avanços, houve um aumento da SG de 2-16 meses para 14-24 meses (3).

Para o tratamento das metástases cerebrais, sempre que possível, é preferível a intervenção cirúrgica, nomeadamente em lesões únicas com tamanho reduzido e fácil acesso cirúrgico (3), embora a radioterapia seja também uma opção. Em ensaios randomizados que incluíram doentes com cancro do pulmão e da mama, a sobrevivência média em doentes tratadas com radioterapia holocraneana variou entre quatro e seis meses, ao custo de toxicidade importante como a deterioração cognitiva (4,5,6). O desenvolvimento de técnicas estereotáxicas também melhorou significativamente a qualidade de vida destas pacientes, associada a uma menor toxicidade neurológica (1,2,3). Com o aparecimento de múltiplas terapias, o paradigma mudou e novas abordagens sistémicas mostraram aumentar a sobrevivência das pacientes e preservar a qualidade de vida (1,3).

Este artigo visa rever as diferentes opções terapêuticas para o tratamento de doentes com CM HER2+ com metástases cerebrais. Além disso, é analisada uma coorte de doentes portuguesas com cancro de mama HER2+, e apresentado um estudo clínico com as doentes que desenvolveram metástases cerebrais.

## Materials and Methods

### *Literature review*

A literature search in the PubMed database, using the keywords “HER2 breast cancer” and “brain metastases” was conducted. Articles published in English between January 2006 and June 2020 were selected. In this narrative review, original articles were selected based on their clinical and scientific relevance. The objective was to describe the impact of the HER2-targeting agents pertuzumab, trastuzumab emtansine (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab deruxtecan and, tucatinib on the treatment of patients with HER2+ breast cancer and BM.

### *Observational study*

Patients with HER2+ BC who were diagnosed and treated at Centro Hospital Universitário do Algarve and Centro Hospitalar Barreiro-Montijo between January 2018 and December 2019, were included in this study. Additional inclusion criteria were patients with HER2+ breast carcinoma, submitted to neoadjuvant therapy with double anti-HER2 block with trastuzumab and pertuzumab, followed by surgery. We excluded patients with stage IV disease at diagnosis and patients who progressed during neoadjuvant therapy.

The following parameters were analyzed by reviewing the electronic medical records of the patients and according to oncology and pathology services protocols: initial stage, lymph nodes status, expression of hormone receptors, Ki-67, type of surgery, type of adjuvant therapy, distant recurrence, and pathological response. The cases where brain metastases were detected during this preliminary follow-up were characterized. Descriptive statistics were used whenever appropriate.

## Results and Discussion

According to our literature research, the following HER2-targeting agents may be used in the treatment of patients with HER2+ breast cancer and brain metastases: pertuzumab, trastuzumab emtansine (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab deruxtecan and, tucatinib. In the following sub-sections, the clinical use of these drugs for this purpose is reviewed.

## Material e Métodos

### *Revisão de literatura*

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed usando as palavras-chave “HER2 breast cancer” e “brain metastases”. Foram seleccionados artigos publicados em inglês entre Janeiro 2006 e Junho 2020. Nesta revisão narrativa, foram seleccionados artigos originais com base na sua relevância clínica e científica. O objetivo foi descrever o impacto dos vários agentes anti HER2, pertuzumab, trastuzumab-emtansina (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab deruxtecan e tucatinib, no tratamento de doentes com cancro da mama HER2+ e metástases cerebrais.

### *Estudo observacional*

Analisámos doentes com CM HER2+, diagnosticadas e tratadas no Centro Hospitalar Universitário do Algarve e Centro Hospitalar Barreiro-Montijo, entre Janeiro 2018 e Dezembro 2019. Foram incluídas doentes com CM HER2+, submetidas a tratamento neoadjuvante com duplo bloqueio anti-HER2 com trastuzumab e pertuzumab, seguida de cirurgia. Foram excluídas doentes com CM HER2+ estágio IV ao diagnóstico ou que progrediram durante o tratamento neoadjuvante.

Foram analisados os seguintes parâmetros, através da consulta aos processos clínicos electrónicos e de acordo com os protocolos dos serviços de oncologia e anatomia patológica: estadio inicial, expressão dos recetores hormonais, Ki-67, tipo de cirurgia, tratamento adjuvante, recidiva a distância e resposta patológica. Foram caracterizados os casos em que foram detetadas metástases cerebrais durante o seguimento.

## Resultados e Discussão

De acordo com a nossa pesquisa na literatura, os seguintes agentes anti-HER2 podem ser usados no tratamento de doentes com CM HER2+ e metástases cerebrais: pertuzumab, trastuzumab emtansina (T-DM1), lapatinib, neratinib, trastuzumab deruxtecan e tucatinib. Nas subseções a seguir, é revista a evidência científica sobre a utilização destes fármacos neste contexto.

## **Monoclonal antibodies**

### ***Pertuzumab***

Pertuzumab is a monoclonal antibody that prevents heterodimerization of the HER2 receptor with other receptors in the EGFR family (8). The study that led to its approval in first-line treatment for patients with metastatic HER2+ BC (CLEOPATRA) excluded patients with brain metastases. However, in the follow-up of these patients, it was found that therapy with trastuzumab, pertuzumab, and docetaxel did not reduce the incidence of brain metastasis but delayed its onset (11.9 months in the placebo group versus (vs.) 15 months in the pertuzumab-treated group, HR = 0.58, 95% CI 0.39-0.85,  $p = 0.0049$ ) (7). Final results of the CLEOPATRA study showed 8-year overall survival rates of 37% (95% CI 31–42) in the pertuzumab group and 23% (95% CI 19–28) in the placebo group (8).

In a real-life study, known as RePER, on the use of double anti-HER2 blockade first-line treatment, 21 of the 264 patients presented brain metastases at baseline. The rate of 2-year OS was 77.7% in those patients and 83.9% in patients without brain metastases (9).

### ***Antibody-drug conjugates***

#### ***Trastuzumab-emtansine***

Trastuzumab-emtansine (T-DM1) is a conjugated monoclonal antibody bound with tubulin inhibitor maytansine (10). The EMILIA trial evaluated the efficacy of T-DM1 vs. lapatinib and capecitabine. This study included 95 patients with brain metastasis. In this subset of patients, T-DM1 has shown an increase in OS (hazard ratio 0.38,  $p = 0.008$ , mean 26.8 vs. 12.9 months) (10). However, this data should be interpreted with caution since no increase in progression-free survival (PFS) was observed and, therefore, this difference in OS may be related to subsequent therapies and extracranial disease control (10).

In the KAMILLA study, the largest observational study of T-DM1-treated patients to date, patients with brain metastasis ( $n = 398$ ) showed similar results to those without metastasis to this organ (PFS of about 7 months and OS of 27 months) (11). It is necessary to consider that this study excluded patients with neurological symptoms caused by brain metastases or with brain-limited metastasis. Special consideration needs to be given to the risk for radionecrosis associated with this agent (12).

## **Anticorpos monoclonais**

### ***Pertuzumab***

Pertuzumab é um anticorpo monoclonal que impede a heterodimerização do recetor HER2 com outros recetores da família EGFR (8). O estudo que levou à sua aprovação no tratamento em primeira linha nos doentes com CM HER2+ metastático (CLEOPATRA) excluiu doentes com metástases cerebrais. No entanto, no seguimento destas pacientes, verificou-se que o tratamento com trastuzumab, pertuzumab e docetaxel não reduziu a incidência de metástases cerebrais, mas atrasou o seu aparecimento (11,9 meses no braço placebo versus 15 meses no braço tratado com pertuzumab, RP = 0,58, 95% IC 0,39-0,85,  $p = 0,0049$ ) (7). Os resultados finais do estudo CLEOPATRA mostraram taxas de SG aos 8 anos de 37% (95% IC 31-42) no grupo pertuzumab e de 23% (95% IC 19-28) no grupo placebo (8).

No RePER, um estudo de vida real sobre o uso do duplo bloqueio anti-HER2 em primeira linha, 21 das 264 pacientes apresentavam metástases cerebrais ao diagnóstico. A taxa de SG aos 2 anos foi de 77,7% nestas pacientes e 83,9% em pacientes sem metástases cerebrais (9).

### ***Anticorpos monoclonais conjugados***

#### ***Trastuzumab-emtansina***

Trastuzumab-emtansina (T-DM1) é um anticorpo monoclonal conjugado com um inibidor da tubulina (10). O estudo EMILIA avaliou a eficácia do T-DM1 vs. lapatinib e capecitabina. Este estudo incluiu 95 pacientes com metástases cerebrais. Neste subgrupo de pacientes, o T-DM1 mostrou aumentar a SG (RR 0,38,  $p = 0,008$ , média 26,8 vs. 12,9 meses) (10). No entanto, estes dados devem ser interpretados com cautela, uma vez que não se verificou aumento na sobrevivência livre de progressão (SLP) e, portanto, a diferença na SG pode estar relacionada com terapêuticas subsequentes e controlo da doença extracraniana.

No estudo KAMILLA, o maior estudo observacional de pacientes tratadas com T-DM1 até ao momento, doentes com metástases cerebrais ( $n = 398$ ) mostraram resultados semelhantes àqueles sem metástase neste órgão (SLP de cerca de 7 meses e SG de 27 meses) (11). É necessário ter em conta que este estudo excluiu doentes com sintomas neurológicos. Deve ser especialmente considerado o risco de radionecrose associado a este agente (12).

*Trastuzumab deruxtecan*

Trastuzumab deruxtecan is an antibody-drug conjugate composed of an anti-HER2 antibody, a cleavable tetrapeptide-based linker, and a cytotoxic topoisomerase I inhibitor (13).

The phase II DESTINY-Breast01 study (13) examined the efficacy of trastuzumab deruxtecan in patients with previously treated HER2+ BC who had received previous treatment with T-DM1. Data showed that in 184 patients who had undergone a median of six previous lines of treatment, the confirmed objective response rate (ORR) with trastuzumab deruxtecan was 60.3% and the median duration of response (DOR) was 14.8 months. The median PFS was 16.4 months (95% CI, 12.7 to not reached) among all patients and 18.1 months (95% CI, 6.7 to 18.1) among the 24 enrolled patients with treated and asymptomatic brain disease. Estimated OS at 6 months was 93.9% (95% CI, 89.3 to 96.6) and 86.2% (95% CI, 79.8 to 90.7) at 12 months; median OS was not reached at the time of the publication. The most frequent grade 3 or 4 side effects were neutropenia (20.7%), anaemia (8.7%), and nausea (7.6%). Adverse events that led to discontinuation included pneumonitis (in 11 patients) and interstitial lung disease (in 5 patients) (13).

***Small molecule tyrosine kinase inhibitors****Lapatinib*

Lapatinib is a reversible tyrosine kinase inhibitor of the EGFR (HER1) and HER2 receptors (14). In the LANDSCAPE clinical trial, Bachelot et al. investigated the role of the combination of lapatinib with capecitabine in 45 patients without previous WBRT treatment. The results showed a partial response to the lesions in 65.9% of cases and achieved an improvement of neurological symptoms in 58% of cases. The average time until progression to the brain was 5.5 months (14).

Lapatinib was also tested in combination with trastuzumab. Lin et al. (15) reported an objective brain response rate of 79% and a median OS of 19 months in a prospective study with 28 patients. Furthermore, Bartsch et al. (16) showed a significant prolongation of OS in the group treated with lapatinib and trastuzumab ( $p = 0.002$ ) in a retrospective study (25 patients).

The role of lapatinib to prevent brain metastases was tested in the CEREBEL trial, where patients were randomly assigned to receive lapatinib-capecitabine or trastuzumab-capecitabine (17). Brain metastases as the first site of relapse occurred in 3% (8 of 251 patients)

*Trastuzumab deruxtecan*

Trastuzumab deruxtecan é um anticorpo monoclonal conjugado, constituído por um anticorpo anti-HER2, um ligando clivável tetrapeptídico e um citotóxico inibidor da topoisomerase I (13).

O estudo de fase II DESTINY-Breast01 (13) examinou a eficácia do trastuzumab deruxtecan em doentes com CM HER2 + previamente tratadas com T-DM1. Os dados mostraram que em 184 pacientes submetidas a uma média de seis linhas de tratamento, a taxa de resposta objetiva (TRO) foi de 60,3%, e a duração média da resposta foi de 14,8 meses. A SLP média foi de 16,4 meses (IC de 95%, 12,7 a não alcançado) entre todos doentes e 18,1 meses (IC de 95%, 6,7 a 18,1) entre as 24 doentes com metástases cerebrais já previamente tratadas e assintomáticas. A SG aos 6 meses foi de 93,9% (IC de 95%, 89,3 a 96,6) e 86,2% (IC de 95%, 79,8 a 90,7) aos 12 meses; A SG média não foi alcançada até ao momento da publicação. Os efeitos secundários grau 3 ou 4 mais frequentes foram neutropenia (20,7%), anemia (8,7%) e náusea (7,6%). Os efeitos adversos que levaram à descontinuação incluíram pneumonite (em 11 pacientes) e doença pulmonar intersticial (em 5 pacientes) (13).

***Pequenas moléculas inibidoras da tirosina cinase****Lapatinib*

Lapatinib é um inibidor reversível da tirosina cinase dos recetores EGFR (HER1) e HER2.14 No ensaio clínico LANDSCAPE, Bachelot et al. investigaram o papel da combinação de lapatinib com capecitabina em 45 pacientes sem tratamento prévio com radioterapia holocraneana. Os resultados mostraram resposta parcial em 65,9% dos casos e em 58% houve melhoria dos sintomas neurológicos. O tempo médio até à progressão a nível do cérebro foi de 5,5 meses (14).

Lapatinib também foi testado em combinação com trastuzumab. Lin et al. (15) relataram uma taxa de resposta objetiva a nível cerebral de 79% e uma média do SG de 19 meses num estudo prospetivo com 28 pacientes. Além disso, Bartsch et al. (16) mostraram um prolongamento significativo da SG no grupo tratado com lapatinib e trastuzumab ( $p = 0,002$ ) num estudo retrospectivo (25 doentes).

O papel do lapatinib para prevenir metástases a nível cerebral foi testado no estudo CEREBEL, no qual as pacientes foram aleatoriamente tratadas com lapatinib-capecitabina ou trastuzumab-capecitabina (17).

of the patients treated with lapatinib and 5% (12 of 250 patients) in the trastuzumab group (95% CI, -2% to 5%;  $p=0.360$ ). The trial was inconclusive for the primary endpoint.

### *Neratinib*

Neratinib is an HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor. It irreversibly inhibits the EGFR receptor (HER1), HER2 and HER4 and demonstrated activity in the brain in two clinical trials (18,19).

In the TBCRC 022 study, a phase 2 trial, 49 HER2+ BC patients with brain metastases were treated with neratinib and capecitabine. Twelve of the patients had previously been treated with lapatinib (18). The ORR was 33% and 49% in lapatinib-treated and lapatinib-naive patients, respectively. PFS in pre-treated and lapatinib-naive patients was 3.1 and 5.5 months, respectively, and OS was 15.1 and 13.3 months (18).

The NEfERT-T phase 3 trial (20) randomized 479 women to receive neratinib or trastuzumab combined with paclitaxel as first-line therapy for recurrent or metastatic HER2 disease (3). There was no significant difference in PFS, however, the neratinib group did have a lower incidence of brain recurrence (RR 0.48, 95% CI, 0.29-0.79;  $p = 0.002$ ), as well as a longer time to recurrence at this level (HR 0.45, 95% CI, 0.26-0.78;  $p = 0.004$ ). Grade 3 diarrhea was also a very common and relevant toxicity effect in the neratinib group (30.4% vs. 3.8%).

In the NALA study, (19) a phase III clinical trial, 621 patients (including 101 patients with asymptomatic or stable brain metastases) were randomized into two groups. One group was treated with neratinib and capecitabine and the other group with lapatinib and capecitabine. The risk of progression or death was reduced by 24% with neratinib and capecitabine (HR = 0.76; 95% CI 0.63–0.93;  $p = 0.006$ ). The PFS at 6 and 12 months was 47.2% vs 37.8% and 28.8% vs 14.8% for the neratinib + capecitabine and lapatinib + capecitabine groups, respectively. OS was also superior in the neratinib + capecitabine group, although not statistically significant (HR = 0.88; 95% CI 0.72–1.07;  $p = 0.2086$ ). The incidence of intervention on symptomatic brain metastases was lower in the neratinib group (23%) compared to the lapatinib group (29%) ( $p = 0.043$ ). Again, diarrhea was the most frequent toxicity effect related to neratinib in all clinical trials, being grade 3 in about 30% of the patients.

Metástases cerebrais como primeiro local de recidiva ocorreram em 3% (8 de 251) das doentes tratadas com lapatinib e 5% (12 de 250 doentes) no braço de trastuzumab (IC de 95%, -2% a 5%;  $p = 0,360$ ). O ensaio foi inconclusivo para o objetivo principal.

### *Neratinib*

Neratinib é um inibidor da tirosina cinase do recetor HER2, que inibe irreversivelmente o recetor EGFR (HER1), HER2 e HER4 e demonstrou atividade ao nível cerebral em dois ensaios clínicos (18,19)

No estudo TBCRC 022, um ensaio de fase II, 49 doentes com CM com metástases cerebrais foram tratadas com neratinib e capecitabina, 12 das quais haviam sido tratadas anteriormente com lapatinib (18). A TRO foi de 33% e 49% em doentes tratadas com lapatinib e em doentes não tratadas com lapatinib, respetivamente. A SLP em pacientes pré-tratadas e não previamente tratadas com lapatinib foi de 3,1 e 5,5 meses, respetivamente, e a SG foi de 15,1 e 13,3 meses (18).

O estudo NEfERT-T de fase 3 (19) incluiu 479 mulheres e comparou neratinib ou trastuzumab em combinação com paclitaxel como terapêutica de primeira linha. Não houve diferença estatisticamente significativa na SLP. No entanto, o grupo tratado neratinib teve uma incidência mais baixa de metástases no cérebro (RR 0,48, IC de 95%, 0,29-0,79;  $p = 0,002$ ), bem como um tempo mais prolongado até recidiva a nível cerebral (RR 0,45, IC de 95%, 0,26-0,78;  $p = 0,004$ ). A diarreia grau 3 foi também um efeito de toxicidade muito comum e relevante no grupo do neratinib (30,4% vs. 3,8%).

No estudo NALA, (20) um ensaio clínico de fase III, 621 pacientes (incluindo 101 doentes com metástases cerebrais assintomáticas ou estáveis) foram aleatoriamente distribuídas em dois braços. Um grupo foi tratado com neratinib e capecitabina e o outro grupo com lapatinib e capecitabina. O risco de progressão ou morte foi reduzido em 24% com neratinib e capecitabina (RR = 0,76; IC 95% 0,63-0,93;  $p = 0,006$ ). A SLP aos 6 e 12 meses foi de 47,2% vs 37,8% e 28,8% vs 14,8% para os grupos neratinib + capecitabina e lapatinib + capecitabina, respetivamente. A SG também foi superior no grupo neratinib + capecitabina, embora não estatisticamente significativa (RR = 0,88; IC 95% 0,72-1,07;  $p = 0,2086$ ). A incidência de intervenção cirúrgica em metástases cerebrais sintomáticas foi menor no braço tratado com neratinib (23%) em comparação com o braço do lapatinib (29%) ( $p = 0,043$ ). A diarreia foi o efeito de toxicidade mais frequente relacionado com o



### *Tucatinib*

Tucatinib is a tyrosine kinase inhibitor with a high affinity for the kinase domain of the HER2 receptor and with minimal inhibition of the EGFR receptor, which improves the toxicity profile (21).

In the HER2CLIMB trial, 410 patients with progressing metastatic HER2+ BC after treatment with trastuzumab, pertuzumab, and TDM-1 were randomized to receive treatment with trastuzumab and capecitabine with or without tucatinib (21). About 48% of patients had brain metastases that did not require local approach therapies. PFS was superior with tucatinib vs. placebo (7.8 vs. 5.6 months; hazard ratio, 0.54), as well as OS (21.9 vs. 17.4 months; HR, 0.66) and ORR (41% vs 23%). Among the patients with brain metastases, the estimated PFS at 1 year was 24.9% (95% CI, 16.5 to 34.3) in the tucatinib-combination group and 0% in the placebo combination group. The median duration of PFS was 7.6 months (95% CI, 6.2 to 9.5) and 5.4 months (95% CI, 4.1 to 5.7), respectively. In the tucatinib group, the most frequent adverse events included diarrhea, palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome, fatigue, and nausea.

In a phase 1b trial (22) the combination of tucatinib and T-DM1 showed an objective response rate of 36% in 14 patients with brain metastases (2 patients had a complete response, 3 had a partial response, 7 had stable disease, and 2 were non-evaluable). This combination is under evaluation, in a phase 3 trial (NCT03975647).

### **Observational study**

Our sample included 44 Portuguese patients with HER+ breast carcinoma, submitted to neoadjuvant therapy with double anti-HER2 block with trastuzumab and pertuzumab, followed by surgery. The average age of the patients was 55 years. After neoadjuvant therapy, 18 patients underwent mastectomy and 26 underwent conservative surgery. The rate of complete pathological response in all patients was 61.4%. The characterization of the patients according to their pathologic response is shown in Table 1. In patients who expressed hormone receptors (n=34), the response rate was 58.8%, while in HER2-enriched patients (n=10) it was 70%. Regarding the influence of the tumor size, the complete response rate was 80% in patients with T1 or T2 tumors and 45.8% in patients with T3 or T4. The rate of complete pathological response was 71.4% in patients without nodal involvement and 56.7% in patients with affected nodes.

neratinib em todos os ensaios clínicos, sendo de grau 3 em cerca de 30% das doentes.

### *Tucatinib*

Tucatinib é um inibidor da tirosina cinase com alta afinidade para o domínio cinase do recetor HER2 e com inibição mínima do recetor EGFR, o que melhora o perfil de toxicidade (21).

No ensaio HER2CLIMB, 410 doentes em progressão após tratamento com trastuzumab, pertuzumab e TDM-1 foram selecionadas para receber tratamento com trastuzumab e capecitabina com ou sem tucatinib (21). Cerca de 48% das doentes tinham doença a nível cerebral sem necessidade de terapêutica local. A SLP foi superior com tucatinib vs. placebo (7,8 vs. 5,6 meses; taxa de risco, 0,54), bem como SG (21,9 vs. 17,4 meses; RR, 0,66) e TRO (41% vs. 23%). Entre as doentes com metástases cerebrais, a SLP ao fim de 1 ano foi de 24,9% (IC de 95%, 16,5 a 34,3) no grupo tratado com tucatinib e 0% no grupo placebo. A duração média da SLP foi de 7,6 meses (IC de 95%, 6,2 a 9,5) e 5,4 meses (IC de 95%, 4,1 a 5,7), respetivamente. No grupo do tucatinib, os efeitos adversos mais frequentes foram diarreia, síndrome da eritrodisestesia palmo-plantar, fadiga e náuseas.

Num estudo de fase 1b (22), a combinação de tucatinib e T-DM1 mostrou uma TRO de 36% em 14 pacientes com metástases cerebrais (2 pacientes tiveram resposta completa, 3 resposta parcial, 7 tinham doença estável e 2 não avaliáveis). Esta combinação encontra-se a ser avaliada num estudo de fase 3 (NCT03975647).

### **Estudo observacional**

A nossa amostra incluiu 44 doentes portuguesas com CM HER2+, submetidas a terapêutica neoadjuvante com duplo bloqueio anti-HER2 com trastuzumab e pertuzumab, seguida de cirurgia. A idade média dos doentes foi de 55 anos. Após terapêutica neoadjuvante, 18 doentes foram submetidas a mastectomia e 26 a cirurgia conservadora. A taxa de resposta patológica completa em todas as doentes foi de 61,4%. A caracterização dos doentes de acordo com a resposta patológica é apresentada na Tabela 1. Nos doentes que expressaram recetores hormonais (n = 34), a taxa de resposta patológica completa foi de 58,8%, enquanto que nos doentes com recetores hormonais negativos (n = 10), a taxa de resposta foi de 70%. Em relação à influência do tamanho do tumor, a taxa de resposta completa foi de 80% nas doentes com tumores T1 ou T2 e de 45,8% nas pacientes com T3 ou T4. A taxa de

**Table 1** - Characterization of the BC patients analyzed in this study. pCR – pathologic complete response; cT – tumor classification by clinical stage; cN – lymph nodes affected by clinical stage

**Tabela 1** - Caracterização dos doentes analisados neste estudo. RPC - resposta patológica completa; cT - classificação do tumor por estadio clínico; cN – gânglios afetados por estadio clínico

Characteristic / Característica		No. of patients / No. de pacientes	
		pCR / RPC	Non-pCR / Sem RPC
		27	17
cT	T1-2	16	4
	T3-4	11	13
cN	N0	10	4
	N+	17	13
Hormonal receptors / Recetores hormonais	Positive / Positivo	20	14
	Negative / Negativo	7	3
Ki-67	>20	18	12
	≤20	9	5
Surgery / Cirurgia	Mastectomy / Mastectomia	7	11
	Conservative surgery / Cirurgia conservadora	20	6
Adjuvant HER2 treatment / Tratamento adjuvante HER2	Trastuzumab	26	15
	Trastuzumab and (e) Pertuzumab	1	0
	T-DM1	0	2
Distant recurrence / Recidiva a distância		3	0

*Case study of HER2+ BC patients with brain metastases*

Of the 44 patients treated with neoadjuvant trastuzumab and pertuzumab with a mean follow-up of 23.9 months, three had a relapse, all at the brain level as the first site of metastasis. Interestingly, these three patients had shown a complete pathological response. The characterization of these patients is shown in Table 2. In Patient 1, relapse occurred 17.87 months after breast surgery. The brain lesion was resected, but, unfortunately, brain progression occurred one month after surgery. She

resposta patológica completa foi de 71,4% em pacientes sem envolvimento ganglionar e 56,7% em pacientes com gânglios afetados.

*Casos clínicos dos doentes com CM HER2+ com metástases cerebrais*

Das 44 doentes tratadas com trastuzumab neoadjuvante e pertuzumab com seguimento médio de 23,9 meses, 3 apresentaram recidiva, todas a nível cerebral. Curiosamente, estas três doentes tinham obtido resposta

**Table 2** - Characterization of the BC patients with brain relapse in this study. T: trastuzumab; P: pertuzumab; L: lapatinib; C: capecitabine

**Tabela 2** - Caracterização dos doentes com CM que apresentaram recidiva cerebral neste estudo. T: trastuzumab; P: pertuzumab; L: lapatinib; C: capecitabine

	Patient 1 / Doente 1	Patient 2 / Doente 2	Patient 3 / Doente 3
Stage at diagnosis / Estadio inicial	cT3N3	cT2N1	cT4N1
Hormone receptor status / Expressão de receptores hormonais	Negative / Negativo	Negative / Negativo	Negative / Negativo
Time between breast surgery and brain relapse / Tempo entre a cirurgia da mama e a recidiva cerebral	17.87 months / meses	7.16 months / meses	6 days / dias
Surgery for brain metastases / Cirurgia nas metástases cerebrais	Yes / Sim	No / Não	No / Não
1st line treatment / 1ª linha de tratamento	Docetaxel+T+P	T-DM1	T-DM1
2nd line treatment / 2ª linha de tratamento	-	L+C	L+C
3rd line treatment / 3ª linha de tratamento	-	T+Vinorelbine	-
4rd line treatment / 4ª linha de tratamento	-	T+Gemcitabine	-
Overall survival (months) / Sobrevivência global (meses)	46.03	36.73	30.33

received WBRT and then started systemic treatment. In Patients 2 and 3, brain relapse occurred soon after breast surgery. The three patients received WBRT and then started systemic treatment. To date, Patient 1 is under first-line treatment with trastuzumab and pertuzumab with stable disease and with no extra-brain disease. Patients 2 and 3 have died.

Only a few reports have examined risk factors for the development of brain metastases as the first site of metastatic disease in HER2+ breast cancer patients who received neoadjuvant treatment. In a cohort of 130 patients treated with neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab and pertuzumab, the rate of BM as the first presentation of distant disease was 3.8% (3/77) and 3.7%

patológica completa. A caracterização dessas pacientes é apresentada na Tabela 2. Na doente 1, a recidiva ocorreu 17,87 meses após a cirurgia do tumor primário. A metástase cerebral foi excisada, mas, infelizmente, apresentou recaída 1 mês após a cirurgia. Foi tratada posteriormente com radioterapia holocraneana e iniciou tratamento sistêmico. Nas doentes 2 e 3, a recidiva cerebral ocorreu logo após a cirurgia de mama. As três doentes receberam radioterapia holocraneana e depois iniciaram tratamento sistêmico. Até ao momento, a doente 1 está sob tratamento de 1ª linha com trastuzumab e pertuzumab, com doença estável e sem doença extra-cerebral. As pacientes 2 e 3 faleceram.

Apenas alguns estudos verificaram quais os factores de risco para o desenvolvimento de metástases no cérebro em doentes com CM HER2+ como primeiro local de recidiva após terapêutica neoadjuvante. Numa coorte de 130 pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante com trastuzumab e pertuzumab, a taxa de metástases cerebrais como primeiro local de

(2/53) in patients with pCR and non-pCR, respectively (23). However, the median time to development of BM was longer in patients with pCR (35 vs 11.7 months). In our cohort, brain relapse occurred in 1.1% (3/27) of patients with pCR. These three patients presented large tumors with nodal involvement, which is a risk factor for brain relapse (1). Overall survival of these patients was in accordance with previous studies (3).

In the Katherine study, the incidence of BM at the follow-up of 3 years was 5.9% in patients with residual disease who received TDM1 and 4.3% in patients who received trastuzumab (24). Our very small number of patients treated with adjuvant T-DM1 does not allow us to make conclusions about the effect of this treatment, but at the time of assessment, no patients had relapsed.

Also, the short period between surgery and brain recurrence in 2 out of 3 patients raises questions about the possibility of preexisting metastases at the time of surgery and whether there is a rationale for brain metastases screening in these patients. At this point, no recommendations can be made about this issue. Some current clinical trials are studying the role of brain MRIs in screening for brain metastases before the onset of symptoms and whether this will affect the overall prognosis and quality of life of patients (NCT03617341, NCT03881605, NCT04030507).

## Conclusions

With the development of new molecules with activity in the brain, the biggest challenge is how to integrate surgery and radiotherapy in clinical treatment. As patient survival increases, the consequences of long-term treatments will be observed, namely the cognitive deterioration resulting from radiotherapy. Multiple prognostic models exist to help oncologists make decisions about patients who develop brain metastasis. One of the most used prognostic models is the Modified Breast Graded Prognostic Assessment (GPA), which confirmed that tumor receptor status, age, performance status, and number of BMs can predict OS (25).

Surgery will always play an important role, especially in the case of solitary brain lesions. It has the advantages of reducing tumor burden and allowing a reevaluation of the immunochemistry markers. Discordance in hormone receptors and HER2 status between the

recidiva foi de 3,8% (3/77) e 3,7% (2/53) em doentes com RPC e sem RPC, respetivamente (23). No entanto, o tempo médio para o desenvolvimento de metástases cerebrais foi maior em pacientes com RPC (35 vs 11,7 meses). Na nossa coorte, a recidiva cerebral ocorreu em 1,1% (3/27) das pacientes com RPC. Estas três doentes apresentavam grandes tumores com envolvimento ganglionar, o que constituem factores de risco para a recidiva cerebral (1). A SG destas pacientes esteve de acordo com estudos anteriores (3).

No estudo Katherine, a incidência de metástases cerebrais aos 3 anos de seguimento foi de 5,9% nos doentes sem resposta patológica completa que foram tratados com TDM1 e 4.3% nos doentes tratados com trastuzumab (24). O reduzido número de doentes tratadas com T-DM1 adjuvante não nos permite concluir o efeito deste tratamento; contudo, no momento da avaliação, nenhum doente apresentou recidiva.

Além disso, o curto período entre a cirurgia e a recidiva cerebral em duas das três doentes levanta a questão sobre a possibilidade de metástases preexistentes no momento da cirurgia e se existe um papel para o rastreio de metástases cerebrais nestes doentes. Até agora, nenhuma recomendação pode ser feita sobre este tema. Alguns ensaios clínicos estão a analisar o papel da ressonância magnética cerebral no rastreio de metástases cerebrais antes do início dos sintomas, e se isso afectará o prognóstico geral e a qualidade de vida dos doentes (NCT03617341, NCT03881605, NCT04030507).

## Conclusões

Com o desenvolvimento de novas moléculas com atividade no cérebro, o maior desafio está relacionado com a integração da cirurgia e da radioterapia no tratamento das metástases cerebrais. À medida que vamos aumentando a sobrevivência destas doentes veremos as consequências dos tratamentos a longo prazo, nomeadamente a deterioração cognitiva resultante dos tratamentos de radioterapia. Para auxiliar a decisão do oncologista, existem vários modelos de prognóstico para doentes com metástases cerebrais. Um dos modelos de prognóstico mais usados é o *Graded Prognostic Assessment (GPA)*, o qual confirmou que o status de recetores do tumor, a idade, o estado geral do doente e número de metástases cerebrais podem prever a SG (25).

A cirurgia terá sempre um papel importante, especialmente no caso de lesões cerebrais solitárias.

primary tumor and the metastatic lesion is well known. A large range of receptor discordance with ER, PR, and HER2 (6–40%, 21–41%, and 1–43%, respectively) was described in a previous review (26). Radiosurgery is also an option for some unresectable brain metastases.

Current guidelines recommend that for patients with stable systemic disease at the time of BM diagnosis, the same systemic therapy should be continued, and BM should be treated with local therapy (surgery and/or radiotherapy). For patients with progressive systemic disease at the time of BM diagnosis, clinicians should use the algorithms for the treatment of HER+ metastatic BC (27). These guidelines may change in the very near future, and it may be wise for oncologists to change systemic therapies when brain recurrence occurs even with stable systemic disease. Trastuzumab deruxtecan or tucatinib can be considered in these cases.

Asymptomatic or lightly symptomatic patients with largely disseminated BM at diagnosis are normally referred for treatment with WBRT as a local therapy, however, this may not be the best choice. A change to systemic therapy may be more sensible, even with stable systemic disease, delaying radiotherapy until there is disease progression or there are symptoms related to metastasis. We will also see what role new targeted therapies like trastuzumab, deruxtecan, and tucatinib will play in early disease stages, when they might prevent or delay the onset of metastasis to the brain.

In this study, the neoadjuvant therapy with double anti-HER2 block using trastuzumab and pertuzumab led to higher rates of complete pathological response in patients with lower clinical stage and without nodal involvement. With a preliminary mean follow-up of 23.9 months, three patients (of 44 studied) had a relapse, and the brain was the first site of metastasis in all cases.

The brain may be ceasing to be the sanctuary that we thought it was. The appearance of new molecules with activities in the brain in HER2+ BC inspires new hope for the treatment of these patients. Further investigation is also needed in order to prevent HER2+ BC brain metastases.

Tem a vantagem de reduzir a carga tumoral e permitir uma reavaliação dos marcadores imunohistoquímicos. A discordância nos receptores hormonais e HER2 entre o tumor primário e as lesões metastáticas é bem conhecida. Uma revisão mostrou uma importante discordância dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (6–40%, 21–41% e 1–43%, respetivamente) (26). A radiocirurgia também é uma opção para algumas metástases cerebrais irresecáveis.

As diretrizes atuais recomendam que, para doentes com doença sistémica estável no momento de progressão a nível cerebral, se mantenha o mesmo tratamento sistémico e se aplique tratamento local sobre as metástases (cirurgia e/ou radioterapia). Para doentes com doença sistémica em progressão no momento do diagnóstico das metástases cerebrais, deve ser alterada a terapêutica sistémica conforme os algoritmos recomendados (27). Talvez isto venha a alterar-se muito em breve, e provavelmente deveríamos mudar o tratamento sistémico em casos de recidiva cerebral mesmo com doença sistémica estável. Trastuzumab deruxtecan ou tucatinib podem ser considerados nestes casos.

O tratamento local das metástases cerebrais nem sempre será a melhor escolha, especialmente se o que temos a oferecer é a radioterapia holocraneana. Provavelmente fará sentido em doentes assintomáticas ou pouco sintomáticas, com várias metástases cerebrais ao diagnóstico, que normalmente seriam tratadas com radioterapia holocraneana, alterar o tratamento sistémico mesmo com doença sistémica estável, e reservar a radioterapia para quando houver progressão da doença ou sintomas relacionados com a presença de metástases. Veremos também que papel os novos fármacos como o trastuzumab deruxtecan e tucatinib terão em estadios iniciais, onde poderão prevenir ou retardar o aparecimento de metástases no cérebro.

Neste estudo, a terapia neoadjuvante com duplo bloqueio anti-HER2 com trastuzumab e pertuzumab levou a maiores taxas de resposta patológica completa em doentes com estadio clínico inferior e sem envolvimento ganglionar. Com um seguimento médio preliminar de 23,9 meses, 3 pacientes recaíram, todas a nível cerebral como primeiro local de metastização.

O cérebro pode estar a deixar de ser o santuário que pensávamos. O aparecimento de novas moléculas com atividade no cérebro no cancro de mama HER2+ abre esperança no tratamento destes doentes. São também necessários mais estudos de forma a prevenir a ocorrência de metástases cerebrais no CM HER2+.

### **Authors Contributions Statement**

PL: Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation; EC: Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation; RG: Writing – Original Draft Preparation; MV: Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation; IF: Writing – Original Draft Preparation ; JM: Validation; BG: Validation ; SB: Validation ; JGC: Supervision, Writing - Review & Editing; ASF: Supervision, Writing – Review & Editing

### **Funding**

The authors received no financial support for the research, authorship, or publication of this article.

### **Conflict of Interests**

The authors report no conflicts of interest.

### **Declaração sobre as contribuições do autor**

PL: Investigação, Metodologia, Escrita – Preparação do manuscrito; EC: Investigação, Metodologia, Escrita – Preparação do manuscrito; RG : Escrita – Preparação do manuscrito; MV Investigação, Metodologia, Escrita – Preparação do manuscrito; IF : Escrita – Preparação do manuscrito; JM : Validação; BG : Validação ; SB : Validação ; JGC : Supervisão, Escrita - Revisão & Edição; ASF : Supervisão, Escrita - Revisão & Edição

### **Financiamento**

Os autores não receberam qualquer apoio financeiro para a investigação, autoria ou publicação deste artigo.

### **Conflito de Interesses**

Sem conflitos de interesse

## References / Referências

1. Maurer, C., Tulpin, L., Moreau, M., Dumitrescu, C., de Azambuja, E., Paesmans, M., Nogaret, J. M., Piccart, M. J., & Awada, A. (2018). Risk factors for the development of brain metastases in patients with HER2-positive breast cancer. *ESMO open*, 3(6), e000440. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000440>
2. Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., Nielsen, T. O., & Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), 3271–3277. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820>
3. McKee, M. J., Keith, K., Deal, A. M., Garrett, A. L., Wheless, A. A., Green, R. L., Benbow, J. M., Dees, E. C., Carey, L. A., Ewend, M. G., Anders, C. K., & Zagar, T. M. (2016). A Multidisciplinary Breast Cancer Brain Metastases Clinic: The University of North Carolina Experience. *The Oncologist*, 21(1), 16–20. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0328>
4. Mehta, M. P., Rodrigus, P., Terhaard, C. H., Rao, A., Suh, J., Roa, W., Souhami, L., Bezjak, A., Leibenhaut, M., Komaki, R., Schultz, C., Timmerman, R., Curran, W., Smith, J., Phan, S. C., Miller, R. A., & Renschler, M. F. (2003). Survival and neurologic outcomes in a randomized trial of motexafin gadolinium and whole-brain radiation therapy in brain metastases. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(13), 2529–2536. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.12.122>
5. Suh, J. H., Stea, B., Nabid, A., Kresl, J. J., Fortin, A., Mercier, J. P., Senzer, N., Chang, E. L., Boyd, A. P., Cagnoni, P. J., & Shaw, E. (2006). Phase III study of efaproxiral as an adjunct to whole-brain radiation therapy for brain metastases. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(1), 106–114. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.1768>
6. Borgelt, B., Gelber, R., Kramer, S., Brady, L. W., Chang, C. H., Davis, L. W., Perez, C. A., & Hendrickson, F. R. (1980). The palliation of brain metastases: final results of the first two studies by the Radiation Therapy Oncology Group. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 6(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(80\)90195-9](https://doi.org/10.1016/0360-3016(80)90195-9)
7. Swain, S. M., Baselga, J., Miles, D., Im, Y.-H., Quah, C., Lee, L. F., & Cortés, J. (2014). Incidence of central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: results from the randomized phase III study CLEOPATRA. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(6), 1116–1121. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu133>
8. Swain, S.M, Miles D., Kim, S-B, Im, Y-H., Im, S-A. Semiglazov, V., Ciruelos, E., Schneeweiss, A. Monturus, E., Clark, E., Knott, A. Restuccia, E., Benyunes, M., Cortes, J. (2019). End-of-study analysis from the phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled CLEOPATRA study of first-line pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. ASCO Annual Meeting. Abstract 1020. Presented June 2, 2019. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37 (suppl; abstr 1020). [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15\\_suppl.1020](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.1020)
9. Gamucci, T., Pizzuti, L., Natoli, C., Mentuccia, L., Sperduti, I., Barba, M., Sergi, D., Iezzi, L., Maugeri-Saccà, M., Vaccaro, A., Magnolfi, E., Gelibter, A., Barchiesi, G., Magri, V., D'Onofrio, L., Cassano, A., Rossi, E., Botticelli, A., Moschetti, L., Omarini, C., ... Vici, P. (2019). A multicenter REtrospective observational study of first-line treatment with PERTuzumab, trastuzumab and taxanes for advanced HER2 positive breast cancer patients. RePer Study. *Cancer Biology & Therapy*, 20(2), 192–200. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1523095>
10. Krop, I. E., Lin, N. U., Blackwell, K., Guardino, E., Huober, J., Lu, M., Miles, D., Samant, M., Welslau, M., & Diéras, V. (2015). Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(1), 113–119. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu486>
11. Montemurro F, Ellis P, Delalogue S. (2017). Safety and efficacy of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 399 patients with central nervous system metastases: Exploratory subgroup analysis from the KAMILLA study. Abstract No. P1–12–10, 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium. *Cancer Research* 77(4 Supplement) P1-12-10. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS16-P1-12-10>
12. Stumpf, P. K., Cittelly, D. M., Robin, T. P., Carlson, J. A., Stuhr, K. A., Contreras-Zarate, M. J., Lai, S., Ormond, D. R., Rusthoven, C. G., Gaspar, L. E., Rabinovitch, R., Kavanagh, B. D., Liu, A., Diamond, J. R., Kabos, P., & Fisher, C. M. (2019). Combination of Trastuzumab Emtansine and Stereotactic Radiosurgery Results in High Rates of Clinically Significant Radionecrosis and Dysregulation of Aquaporin-4. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(13), 3946–3953. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2851>
13. Modi, S., Saura, C., Yamashita, T., Park, Y. H., Kim, S. B., Tamura, K., Andre, F., Iwata, H., Ito, Y., Tsurutani, J., Sohn, J., Denduluri, N., Perrin, C., Aogi, K., Tokunaga, E., Im, S. A., Lee, K. S., Hurvitz, S. A., Cortes, J., Lee, C., ... DESTINY-Breast01 Investigators (2020). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(7), 610–621. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914510>
14. Bachelot, T., Romieu, G., Campone, M., Diéras, V., Cropet, C., Dalenc, F., Jimenez, M., Le Rhun, E., Pierga, J. Y., Gonçalves, A., Leheurteur, M., Domont, J., Gutierrez, M., Curé, H., Ferrero, J. M., & Labbe-Devilliers, C. (2013). Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 14(1), 64–71. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70432-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70432-1)
15. Lin, N. U., Freedman, R. A., Ramakrishna, N., Younger, J., Storniolo, A. M., Bellon, J. R., Come, S. E., Gelman, R. S., Harris, G. J., Henderson, M. A., Macdonald, S. M., Mahadevan, A., Eisenberg, E., Ligibel, J. A., Mayer, E. L., Moy, B., Eichler, A. F., & Winer, E. P. (2013). A phase I study of lapatinib with whole brain radiotherapy in patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-positive breast cancer brain metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 142(2), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2754-0>
16. Bartsch, R., Berghoff, A., Pluschnig, U., Bago-Horvath, Z., Dubsky, P., Rottenfusser, A., DeVries, C., Rudas, M., Fitzal, F., Dieckmann, K., Mader, R. M., Gnant, M., Zielinski, C. C., & Steger, G. G. (2012). Impact of anti-HER2 therapy on overall survival in HER2-

- overexpressing breast cancer patients with brain metastases. *British Journal of Cancer*; 106(1), 25–31. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.531>.
17. Pivot, X., Manikhas, A., Żurawski, B., Chmielowska, E., Karaszewska, B., Allerton, R., Chan, S., Fabi, A., Bidoli, P., Gori, S., Ciruelos, E., Dank, M., Hornyak, L., Margolin, S., Nusch, A., Parikh, R., Nagi, F., DeSilvio, M., Santillana, S., Swaby, R. F., ... Semiglazov, V. (2015). CEREBEL (EGF111438): A Phase III, Randomized, Open-Label Study of Lapatinib Plus Capecitabine Versus Trastuzumab Plus Capecitabine in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(14), 1564–1573. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.1794>
  18. Freedman, R. A., Gelman, R. S., Anders, C. K., Melisko, M. E., Parsons, H. A., Cropp, A. M., Silvestri, K., Cotter, C. M., Componeschi, K. P., Marte, J. M., Connolly, R. M., Moy, B., Van Poznak, C. H., Blackwell, K. L., Puhalla, S. L., Jankowitz, R. C., Smith, K. L., Ibrahim, N., Moynihan, T. J., O'Sullivan, C. C., ... Translational Breast Cancer Research Consortium (2019). TBCRC 022: A Phase II Trial of Neratinib and Capecitabine for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer and Brain Metastases. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(13), 1081–1089. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01511>
  19. Awada, A., Colomer, R., Inoue, K., Bondarenko, I., Badwe, R. A., Demetriou, G., Lee, S. C., Mehta, A. O., Kim, S. B., Bachelot, T., Goswami, C., Deo, S., Bose, R., Wong, A., Xu, F., Yao, B., Bryce, R., & Carey, L. A. (2016). Neratinib Plus Paclitaxel vs Trastuzumab Plus Paclitaxel in Previously Untreated Metastatic ERBB2-Positive Breast Cancer: The NEfERT-T Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 2(12), 1557–1564. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0237>
  20. Saura, C., Oliveira, M., Feng, Y. H., Dai, M. S., Chen, S. W., Hurvitz, S. A., Kim, S. B., Moy, B., Delaloge, S., Gradishar, W., Masuda, N., Palacova, M., Trudeau, M. E., Mattson, J., Yap, Y. S., Hou, M. F., De Laurentiis, M., Yeh, Y. M., Chang, H. T., Yau, T., ... NALA Investigators (2020). Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With  $\geq 2$  HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(27), 3138–3149. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00147>
  21. Murthy, R. K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S. A., Lin, N. U., Borges, V., Abramson, V., Anders, C., Bedard, P. L., Oliveira, M., Jakobsen, E., Bachelot, T., Shachar, S. S., Müller, V., Braga, S., Duhoux, F. P., Greil, R., Cameron, D., ... Winer, E. P. (2020). Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(7), 597–609. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914609>
  22. Borges, V. F., Ferrario, C., Aucoin, N., Falkson, C., Khan, Q., Krop, I., Welch, S., Conlin, A., Chaves, J., Bedard, P. L., Chamberlain, M., Gray, T., Vo, A., & Hamilton, E. (2018). Tucatinib Combined With Ado-Trastuzumab Emtansine in Advanced ERBB2/HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA oncology*, 4(9), 1214–1220. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.1812>
  23. Ferraro, E., Barrio, A. V., Patil, S., Robson, M. E., Dang, C. T. (2020) Incidence of brain metastases in patients receiving neoadjuvant chemotherapy (NAC) with trastuzumab and pertuzumab (HP) in HER2-positive early breast cancer (BC). *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(15)\_suppl. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.e12653](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e12653).
  24. von Minckwitz, G., Huang, C. S., Mano, M. S., Loibl, S., Mamounas, E. P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., Fischer, H. H., Jacot, W., Conlin, A. K., Arce-Salinas, C., Wapnir, I. L., Jackisch, C., DiGiovanna, M. P., Fasching, P. A., Crown, J. P., Wülfing, P., ... KATHERINE Investigators (2019). Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 380(7), 617–628. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1814017>.
  25. Subbiah, I. M., Lei, X., Weinberg, J. S., Sulman, E. P., Chavez-MacGregor, M., Tripathy, D., Gupta, R., Varma, A., Chouhan, J., Guevarra, R. P., Valero, V., Gilbert, M. R., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2015). Validation and Development of a Modified Breast Graded Prognostic Assessment As a Tool for Survival in Patients With Breast Cancer and Brain Metastases. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(20), 2239–2245. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.8517>
  26. Criscitiello, C., André, F., Thompson, A. M., De Laurentiis, M., Esposito, A., Gelao, L., Fumagalli, L., Locatelli, M., Minchella, I., Orsi, F., Goldhirsch, A., & Curigliano, G. (2014). Biopsy confirmation of metastatic sites in breast cancer patients: clinical impact and future perspectives. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(2), 205. <https://doi.org/10.1186/bcr3630>
  27. Cardoso, F., Senkus, E., Costa, A., Papadopoulos, E., Aapro, M., André, F., Harbeck, N., Aguilar Lopez, B., Barrios, C. H., Bergh, J., Biganzoli, L., Boers-Doets, C. B., Cardoso, M. J., Carey, L. A., Cortés, J., Curigliano, G., Diéras, V., El Saghir, N. S., Eniu, A., Fallowfield, L., ... Winer, E. P. (2018). 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(8), 1634–1657. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy192>.



## Herpetiform dermatitis (Clinical case)

### *Dermatite herpetiforme (Caso clínico)*

Bruno Sousa <sup>1,2,3</sup>, Nelson Tavares <sup>1,2\*</sup>

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

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

<sup>3</sup>Health Service of Autonomous Region of Madeira, Madeira, Portugal

\* corresponding author: nelson.tavares@ulusofona.pt

Received / Recebido: 03/12/2020

Accepted / Aceite: 26/02/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

A 44-year-old female teacher was referred to the Nutrition Consultation for Dermatology for a gluten-free diet. She had experienced a cluster of red and intensely itchy blisters at the cutaneous level for approximately six months. After a study by Dermatology, a herpetiform dermatitis was diagnosed. While waiting for the Nutrition Consultation, she removed the gluten from her diet and saw improvements in symptoms. Awaiting Gastroenterology Consultation.

**Keywords:** Duhring Brocq disease; dermatitis; herpetiformis; gluten-free diet

#### Anthropometric assessment

Weight: 59.9 kg  
Height: 164 cm  
BMI: 22.3 kg/m<sup>2</sup>  
Usual weight: 62 kg

#### Body composition assessment (TANITA TBF 300®)

Body fat: 28.9%  
Fat mass: 17.3 kg  
Non-fat mass: 42.6 kg  
Total body water: 31.2 kg

Uma mulher de 44 anos, professora, foi encaminhada à Consulta de Nutrição para Dermatologia para dieta sem glúten. Apresenta a nível cutâneo, há cerca de 6 meses, um aglomerado de bolhas avermelhadas e intensamente pruriginosas. Após estudo pela Dermatologia foi diagnosticado uma Dermatite Herpetiforme. Enquanto aguardava pela Consulta de Nutrição retirou o glúten da alimentação e verificou melhorias na sintomatologia. Aguarda Consulta de Gastroenterologia.

**Palavras-chave:** Doença de Duhring Brocq ; dermatite; herpetiforme; dieta isenta de glúten

#### Avaliação antropométrica

Peso: 59,9 kg  
Estatura: 164 cm  
IMC: 22,3 kg/m<sup>2</sup>  
Peso habitual: 62 kg

#### Avaliação da composição corporal (TANITA TBF 300®)

Gordura corporal: 28,9%  
Massa gorda: 17,3 kg  
Massa isenta de gordura: 42,6 kg  
Água corporal total: 31,2 kg

## Analytical Parameters

### Hematology

Red blood cells:  $4.54 \times 10^{12}/L$  (4.50 – 6.40)  
Hemoglobin: 14.2 g/dL (13.0-16.5)  
Hematocrit: 40.9 % (39.8-52.0)  
White blood cells:  $5.64 \times 10^9 /L$  (4.0 – 10.0)  
Neutrophils:  $4.25 \times 10^9 /L$  (1.5– 8.0)  
Eosinophils:  $0.1 \times 10^9 /L$  (<0.5)  
Basophils:  $0.1 \times 10^9 /L$  (<0.3)  
Lymphocytes:  $1.63 \times 10^9 /L$  (0.8-4.0)  
Monocytes:  $0.4 \times 10^9 /L$  (<1.2)  
Sedimentation speed: 7 mm/h (up to 20)

### Biochemistry

Glucose: 97 mg/dL (67 - 110)  
Hemoglobin HbA1c assay: 5.2% (3.8-5.8)  
Urea: 19 mg/dL (10 - 55)  
Creatinine: 0.7 mg/dL (0.6-1.4)  
Uric acid: 4.6 mg/dl (2.4-5.7)  
Glutamic-oxalacetic transaminases: 16 U/L (10 - 35)  
Glutamic-pyruvic transaminases: 12 U/L (10 - 44)  
Glutamyltransferase Range: 10 U/L (5 - 38)  
C-reactive protein: negative  
Total Cholesterol: 184 mg/dl (100-190)  
HDL cholesterol: 54 mg/dl (> 45)  
LDL cholesterol: 115 mg/dl (35-110)  
Triglycerides: 75 mg/dl (5-184)  
  
Calcium: 9.6 mg/dl (8.4-10.4)  
Phosphorus: 3.2 mg/dl (2.4-4.0)  
Magnesium: 1.9 mg/dl (1.6 - 2.6)  
Total vitamin D: 48.0 ng/ml (> 20)  
Folic acid: 11.54 ng/ml (3-17)  
Vitamin B12: 294.10 pg/ml (200-950)

Ferritin: 121.5 ng/ml (9-120)

TSH - Thyrostimulating Hormone: 1.48 UI/L (0.5-6)  
T4 - Tetraiodothyronine: 11.32 µg/dl (4-13)

Gliadin - Ac. IgA: 1.4 AU/ml (<10)  
Gliadin - Ac. IgG: <0.6 AU/ml (<10)

Tissue Transglutaminase - Ac. IgA: 0.3 AU/ml (<10)  
Tissue Transglutaminase - Ac. IgG: <0.4 AU/ml (<10)

*S. cerevisiae* - ASCA, Ac. IgG: 2 U/ml (<10)

Calprotectin: 37 mg/kg (up to 50)

## Parâmetros analíticos

### Hematologia

Glóbulos vermelhos:  $4.54 \times 10^{12}/L$  (4.50 – 6.40)  
Hemoglobina: 14.2 g/dL (13.0-16.5)  
Hematócrito: 40.9% (39.8-52.0)  
Glóbulos brancos:  $5.64 \times 10^9 /L$  (4.0 – 10.0)  
Neutrófilos:  $4.25 \times 10^9 /L$  (1.5– 8.0)  
Eosinófilos:  $0.1 \times 10^9 /L$  (<0.5)  
Basófilos:  $0.1 \times 10^9 /L$  (<0.3)  
Linfócitos:  $1.63 \times 10^9 /L$  (0.8-4.0)  
Monócitos:  $0.4 \times 10^9 /L$  (<1.2)  
Velocidade de sedimentação: 7 mm/h (até 20)

### Bioquímica

Glicose: 97 mg/dL (67 – 110)  
Doseamento da hemoglobina HbA1c: 5,2% (3,8-5,8)  
Ureia: 19 mg/dL (10 – 55)  
Creatinina: 0.7 mg/dL (0,6-1,4)  
Ácido úrico: 4.6 mg/dl (2,4-5,7)  
Transaminase Glutâmico-oxalacética: 16 U/L (10 – 35)  
Transaminase Glutâmico-pirúvica: 12 U/L (10 – 44)  
Gama Glutamilttransferase: 10 U/L (5 – 38)  
Proteína C reativa: negativa  
Colesterol Total: 184 mg/dl (100-190)  
Colesterol HDL: 54 mg/dl (>45)  
Colesterol LDL: 115 mg/dl (35-110)  
Triglicéridos: 75 mg/dl (5-184)  
  
Cálcio: 9,6 mg/dl (8,4-10,4)  
Fósforo: 3,2 mg/dl (2,4-4,0)  
Magnésio: 1,9 mg/dl (1,6 – 2,6)  
Vitamina D total: 48,0 ng/ml (>20)  
Ácido fólico: 11,54 ng/ml (3-17)  
Vitamina B12: 294,10 pg/ml (200-950)

Ferritina: 121,5 ng/ml (9-120)

TSH – Hormona Tiroestimulante: 1.48 UI/L (0,5-6)  
T4 – Tetraiodotironina: 11,32 µg/dl (4-13)

Gliadina – Ac. IgA: 1,4 UA/ml (<10)  
Gliadina – Ac. IgG: <0,6UA/ml (<10)

Transglutaminase Tecidular-Ac. IgA: 0,3 UA/ml (<10)  
Transglutaminase Tecidular-Ac. IgG: <0,4 UA/ml (<10)

*S. cerevisiae* – ASCA, Ac. IgG: 2U/ml (<10)

Calprotectina: 37mg/kg (até 50)

## Clinical evaluation

### *Personal background*

- Allergic rhinitis
- Asthma

### *Complementary diagnostic tests*

Biopsy of skin lesion on the scalp:

The presence of neutrophils, some eosinophils, and nuclear debris along the dermoepidermal junction, are compatible with the diagnosis of Dermatitis herpetiformis.

Intestinal transit: regular

## Eating habits

Wake up at 7 am

Breakfast: 7:30 am

1 cup of unsweetened coffee + 1 gluten-free bread with cheese

Morning snack: 10 am

1 piece of fruit

Lunch: 1 pm

Dish: ¼ of rice / potato dish + meat or fish (120 g) + varied vegetables (150 g) seasoned with olive oil

Dessert: 1 piece of fruit

Afternoon snack: 4:30 pm

1 cup of unsweetened coffee + 1 gluten-free bread with cheese

Dinner: 8 pm

Dish: ¼ of rice / potato dish + meat or fish (120 g) + varied vegetables (150 g) seasoned with olive oil

Go to bed at 10:30 pm

Water / tea consumption: about 1.5 liters of water per day

## Environment, behavior and social

She lives with her husband and two teenage children. In view of the pandemic situation, it is limited to her family and professional life, with no social activities. She states that the current situation has also conditioned her physical exercise routine.

## Avaliação clínica

### *Antecedentes pessoais:*

- Rinite alérgica
- Asma

### *Exames complementares de diagnóstico*

Biopsia de lesão cutânea do couro cabeludo:

A presença de neutrófilos, alguns eosinófilos e detritos nucleares, ao longo da junção dermoepidérmica, são compatíveis com o diagnóstico de Dermate herpetiforme.

Trânsito intestinal: regular

## Hábitos alimentares

Acorda às 7h

Pequeno-almoço: 7h30

1 chávena de café sem açúcar + 1 pão sem glúten com queijo

Lanche da manhã: 10 h

1 peça de fruta

Almoço: 13h

Prato: ¼ do prato de arroz / batata + carne ou peixe (120 g) + verdura variada (150 g) temperada com azeite

Sobremesa: 1 peça de fruta

Lanche da tarde: 16h30

1 chávena de café sem açúcar + 1 pão sem glúten com queijo

Jantar: 20h

Prato: ¼ do prato de arroz/batata + carne ou peixe (120 g) + verdura variada (150 g) temperada com azeite

Deita-se às 22h30

Consumo de água/chá: cerca de 1,5 litros de água por dia

## Ambiente, comportamento e social

Vive com o marido e com os dois filhos adolescentes. Face à situação pandémica, limita-se à sua vida familiar e profissional, não existindo atividades sociais. Refere que a situação atual também tem condicionado a sua prática de exercício físico.

## Questions

1. What is herpetiform dermatitis?
2. Do patients with herpetiform dermatitis have any enteropathy?
3. Is herpetiform dermatitis not related to herpesvirus?
4. What is the appropriate treatment for this pathology in addition to the pharmacological approach?
5. What are the consequences of adherence to a gluten-free diet by patients with herpetiform dermatitis?

## Authors Contributions Statement

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

## Acknowledgements

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

## Conflict of Interests

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

## Questões

1. O que é a dermatite herpetiforme?
2. Os pacientes com dermatite herpetiforme apresentam alguma enteropatia?
3. A dermatite herpetiforme não está relacionada com o herpesvírus?
4. Qual o tratamento adequado a esta patologia para além da abordagem farmacológica?
5. Quais as consequências da adesão a uma dieta sem glúten por pacientes com dermatite herpetiforme?

## Declaração sobre as contribuições do autor

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

## Agradecimentos

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

## Conflito de Interesses

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

**Answers**

1. Herpetiform dermatitis (HD), or Dühring, Brocq disease, is a chronic, benign inflammatory skin disease, considered the specific cutaneous manifestation of celiac disease (CD). It is characterized: (i) symmetrical polymorphic lesions involving typical areas, such as the extensor aspects of the limbs and sacral region, (ii) a predominant neutrophilic infiltrate in the dermal papillae in histopathology, (iii) granular IgA deposits along the dermoepidermal junction, (iv) an invariable association with celiac disease, and (v) a lifelong response to a gluten-free diet.

2. Small bowel involvement is generally asymptomatic and only about 20% of HD people have gastrointestinal symptoms of celiac disease (CD).

Intestinal biopsy in HD shows alterations identical to those of CD, but lighter lesions with different distribution predominate, such as the existence of a subtle infiltrative pattern with partial atrophy or without villous atrophy, and at least 80% of individuals with HD have some degree of histological changes in the small intestine.

3. The term herpetiform describes the way the blisters are grouped (similar to the rash caused by some herpesviruses), but there is no relationship between the diseases.

4. After diagnosis, a strict gluten-free diet (GFD) must be implemented, which is considered the basis of HD treatment and must be maintained for life. However, with the return to a normal diet, the disease may recur. 5. Skin lesions are reversed, but recovery can be slow and may take up to two years after beginning a GFD to completely disappear. A GFD reverses gastrointestinal symptoms more quickly.

The early institution of a GFD is mandatory, since, in addition to ensuring a good clinical evolution of HD and CD, it prevents future complications, namely small intestine lymphoma.

**Respostas**

1. A dermatite herpetiforme (DH), ou doença de Dühring Brocq, é uma doença inflamatória cutânea crónica, benigna, considerada a manifestação cutânea específica da doença celíaca (DC). É caracterizada: (i) lesões polimórficas simétricas envolvendo áreas típicas, como os aspectos extensores dos membros e região sacral, (ii) um infiltrado neutrofilico predominante nas papilas dérmicas na histopatologia, (iii) depósitos granulares de IgA ao longo da junção dermoepidérmica, (iv) uma associação invariável com doença celíaca, e (v) uma resposta vitalícia a uma dieta livre de glúten.

2. O envolvimento do intestino delgado é geralmente assintomático e apenas cerca de 20% dos indivíduos com DH têm sintomas gastrointestinais de doença celíaca (DC).

A biopsia intestinal na DH mostra alterações idênticas às da DC, mas predominam lesões mais ligeiras e com diferente distribuição, como a existência de um padrão infiltrativo subtil com atrofia parcial ou sem atrofia das vilosidades e pelo menos 80 % dos indivíduos com DH apresentam algum grau de alterações histológicas no intestino delgado.

3. O termo herpetiforme descreve a forma como as bolhas se agrupam (semelhante à erupção cutânea causada por alguns herpesvírus), mas sem relação entre as doenças.

4. Após diagnóstico deve ser implementada uma rigorosa dieta livre de glúten (DLG), sendo esta considerada a base do tratamento da DH e devendo ser mantida para toda a vida. Porém, com o retorno a uma dieta normal, a doença pode ter recidivas. 5. Ocorre reversão das lesões cutâneas, mas a recuperação pode ser lenta, podendo demorar até cerca de dois anos após a DLG para o completo desaparecimento. A DLG reverte mais rapidamente os sintomas gastrointestinais.

A instituição precoce de DLG é mandatória, uma vez que, para além de assegurar uma boa evolução clínica da DH e da DC, previne complicações futuras, nomeadamente o linfoma do intestino delgado.

## References / Referências

1. Reunala, T., Salmi, T. T., Hervonen, K., Kaukinen, K., & Collin, P. (2018). Dermatitis Herpetiformis: A Common Extraintestinal Manifestation of Coeliac Disease. *Nutrients*, 10(5), 602. <https://doi.org/10.3390/nu100506022>.
2. Caproni, M., Antiga, E., Melani, L., Fabbri, P., & Italian Group for Cutaneous Immunopathology (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 23(6), 633–638. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03188.x2>
3. Antiga, E., Maglie, R., Quintarelli, L., Verdelli, A., Bonciani, D., Bonciolini, V., & Caproni, M. (2019). Dermatitis Herpetiformis: Novel Perspectives. *Frontiers in immunology*, 10, 1290. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01290>

## Type 1 medication review based on a pharmacy's electronic medication records: first steps towards an algorithm to stratify patients for tailored pharmacy services

*Revisão terapêutica tipo 1 com base nos registos eletrónicos da farmácia: primeiros passos para o desenho de um algoritmo que permite estratificar doentes para a prestação de serviços de farmácia personalizados*

Ligia Reis <sup>1,2</sup>, Miguel Monteiro <sup>2</sup>, Luis Lourenço <sup>1</sup>, João Gregório <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Farmácia Central do Cacém, Praceta Aquilino Ribeiro, 5/6 – r/c, 2735-060 Agualva-Cacém, Portugal

\*corresponding author: joao.gregorio@ulusofona.pt

---

### Abstract

Algorithms, queries, and knowledge-based systems are among approaches to screen electronic patient records stored in databases and support pharmacist medication reviews. The aim of this study was to perform a type 1 medication review and identify clusters that enable the definition of an algorithm to tailor pharmacy professional intervention. A retrospective observational study was conducted on a convenience sample of pharmacy records. Records were included if patients had a medication dispensing history between June 2017 - July 2018 and used two or more chronic medications. Statistical analysis used a two-step cluster to identify common characteristics among fifty-five sets of patient records which underwent Type 1 medication review. The median number of drugs used per patient was five [IQR: 3.0 – 7.0]. 18.2% of patients had inappropriate drugs, and 30.9% had moderate or major interaction potential. Four clusters were identified based on the variables of interactions, number of drugs used, contraindications, Beers criteria and measurable biomarkers, allowing to envision possible pharmaceutical interventions, as well as the priority in providing that intervention. The identification of patient clusters via medication review of electronic records of pharmacy patients supports the design of criteria-based algorithms, likely to be automated.

**Keywords:** Pharmaceutical services; medication review; electronic health records; algorithms

---

### Resumo

Algoritmos, queries e sistemas baseados em conhecimento são algumas abordagens que permitem ao realizar revisão terapêutica do tipo 1 aos registos eletrónicos de doentes (RED). O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão terapêutica do tipo 1 numa amostra de RED de uma farmácia comunitária, permitindo a identificação de *clusters* que sinalizem os doentes que requerem intervenções farmacêuticas. Estudo observacional retrospectivo numa amostra de conveniência de RED. Foram incluídos os RED com histórico de dispensa entre junho de 2017 e julho de 2018 e que apresentavam 2 ou mais medicamentos crónicos. Utilizou-se o método de análise de *clusters* em duas fases para identificar características comuns entre os doentes. Cinquenta e cinco RED foram submetidos à revisão terapêutica tipo 1. A mediana do número de medicamentos usados foi de cinco [IQR: 3,0 – 7,0]. 18,2% dos doentes usavam medicamentos inapropriados e 30,9% possuíam potencial moderado ou grave de interação entre medicamentos. Foram identificados quatro *clusters*, aos quais foram atribuídas as intervenções farmacêuticas consideradas mais adequadas, bem como a prioridade da sua prestação. A revisão terapêutica aplicada aos RED permitiu a identificação de clusters de doentes, o que, por sua vez, permitirá o desenho de um algoritmo baseado em critérios com possibilidade de ser automatizado.

**Palavras-chave:** Serviços farmacêuticos; revisão terapêutica; registos eletrónicos medicamentos; algoritmos

## Introduction

As the burden of Non-Communicable Diseases (NCD) increases globally, chronic disease management has become central to every health system (1). Among several models to deal with this threat, the Chronic Care Model has emerged as an interprofessional collaboration model suited to the challenges brought by NCD's high burden on health systems (2). This model has in turn provided the context to the rethinking of health professionals' roles and duties (3). Community pharmacists have joined this movement after the emergence of pharmaceutical care concepts and the implementation of several projects that showcased community pharmacists as effective primary care professionals (4).

Since the 1990s, medication reviews were included in community pharmacy practice. Pharmacist-led medication review services are available in Europe (UK, NL, BE, SE, DK), United States of America (USA), Australia, Canada and New Zealand (5,6). The Pharmaceutical Care Network Europe (PCNE) defines medication review as "a structured evaluation of patients' medications with the aim of optimizing medication use and improving health outcomes". This entails detecting drug related problems (DRPs) and recommending interventions (7). Four types of review are identified depending on the patient information available to the pharmacist (Table 1). All types of Medication reviews are always constituted by a diagnostic intervention that aims to identify DRPs. All but type 1 require the patient to be present at the point of care, both to gather important information and to provide an educational intervention to support patient knowledge and adherence (8).

When provided, medication reviews resulted in a decrease in the number of drug-related problems, more changes in medication, more drugs with decreased dosage, and a greater decrease or smaller increase in the number of drugs (6). The reviews also have a positive benefit on patient outcomes specifically on the attainment of clinical biomarkers goals (5), and improvement of process outcomes such as reduced polypharmacy, more appropriate formulations, and more appropriate choices of medications (8). The appropriateness of medications can also be assessed with different tools. Among them, Beers' criteria is one of the most commonly used (9), assisting healthcare providers in improving medication safety in older adults by identifying medications for which the risks of their use outweigh the benefits (10).

## Introdução

À medida que a carga das doenças não transmissíveis (DNT) aumenta globalmente, a gestão das doenças crónicas torna-se central para todos os sistemas de saúde (1). Entre os vários modelos para lidar com esta ameaça, o Modelo de Cuidados Crónicos emergiu como um modelo de colaboração interprofissional adequado aos desafios trazidos pela elevada carga das DNT sobre os sistemas de saúde (2). Este modelo, por sua vez, forneceu o contexto para repensar os papéis e deveres dos profissionais de saúde (3). Os farmacêuticos comunitários aderiram a este movimento após o surgimento de conceitos de Cuidados Farmacêuticos e a implementação de vários projetos posicionaram o farmacêutico comunitário como um profissional de cuidados de saúde primários efetivo (4).

Desde a década de 1990, as revisões terapêuticas foram incluídas na prática da farmácia comunitária. O serviço de revisão terapêutica conduzido por farmacêuticos está disponível na Europa (UK, NL, BE, SE, DK), Estados Unidos da América (EUA), Austrália, Canadá e Nova Zelândia (5,6). A *Pharmaceutical Care Network Europe* (PCNE) define a revisão terapêutica como "uma avaliação estruturada dos medicamentos dos doentes com o objetivo de otimizar o uso de medicamentos e melhorar os resultados em saúde". Isso envolve a deteção de problemas relacionados a medicamentos (PRM) e a recomendação de intervenções (7). Conhecem-se quatro tipos de revisão, dependendo das informações do doente disponíveis para o farmacêutico (Tabela 1). Todos os tipos de revisão terapêutica incluem uma intervenção diagnóstica que visa identificar PRM. Todos, exceto o tipo 1, requerem a presença do doente tanto para recolher informações importantes quanto para prestar uma intervenção educacional que promova o conhecimento e a adesão do doente (8).

Quando realizadas, as revisões terapêuticas resultam numa diminuição do número de PRM, ajustes à medicação, diminuição de doses e uma diminuição ou ligeiro aumento do número de medicamentos utilizado pelo utente (6). Evidenciam ainda um benefício positivo nos resultados, especificamente nos biomarcadores clínicos (5), e na melhoria dos resultados do processo, como redução da polimedicação, adequação da formulação e escolha mais adequada de medicamento (8). Neste processo a avaliação de medicamentos potencialmente inapropriados pode ser realizada com diferentes ferramentas. Entre estas, o critério de Beers é uma das mais utilizadas (9), auxiliando os profissionais de saúde a promover a segurança dos medicamentos



**Table 1 - Types of medication review (PCNE 2012)**  
**Tabela 1 - Tipos de revisão terapêutica (PCNE 2012)**

TYPE	DESCRIPTION
<b>Type 1 - Simple medication review</b>	Based on the available medication history (electronic medication record) in the pharmacy, this non-clinical review addresses simple issues relating to the medication with the purpose of highlighting more complex issues for other type of review or services. Useful to reveal drug interactions, some side-effects, unusual dosages and some adherence issues.
<b>Type 2A - Intermediate medication review</b>	Performed when the patient can be approached for information, this review is based on medication history and patient information. Helps to detect drug interactions, some side-effects, unusual dosages, adherence issues, drug-food interactions, effectiveness issues, side effects, and problems with over-the-counter (OTC) medicines.
<b>Type 2B - Intermediate medication review</b>	Performed if medical information is also available, this review is based on medication history and medical information. It reveals drug interactions, some side-effects, unusual dosages, adherence issues, drug-food interactions, effectiveness issues, indication without a drug and drugs without indication.
<b>Type 3 - Advanced medication review</b>	Based on medication history, patient information, and clinical information. Enables the identification of drug interactions, some side-effects, unusual dosages adherence issues, drug-food interactions, effectiveness issues, side effects, problems with OTC, indication without a drug and drugs without indication, dosage issues.

TIPO	DESCRIÇÃO
<b>Tipo 1 – revisão simples</b>	Baseada no histórico de medicamentos disponíveis na farmácia (registo eletrónico de medicamentos), esta revisão, não clínica, aborda questões simples relacionadas com a terapêutica com o objetivo de destacar questões mais complexas para outro tipo de revisão ou serviço. Útil para revelar interações medicamentosas, algumas reações adversas, doses incomuns e alguns problemas de adesão.
<b>Tipo 2A – revisão intermédia</b>	Realizada quando o doente pode ser abordado para obter informações, esta revisão é baseada no histórico de terapêutica e nas informações do doente. Ajuda a detetar interações medicamentosas, algumas reações adversas, doses incomuns, problemas de adesão, interações com alimentos, problemas de eficácia, efeitos colaterais e problemas com medicamentos não sujeitos a receita médica.
<b>Tipo 2B – revisão intermédia</b>	Realizada quando a informação médica também está disponível; esta revisão é baseada no histórico de medicamentos e na informação clínica. Identifica interações medicamentosas, algumas reações adversas, doses incomuns, problemas de adesão, interações com alimentos, problemas de eficácia, necessidade adicional de terapêutica e medicação desnecessária.
<b>Tipo 3 – revisão avançada</b>	Com base no histórico de medicamentos, informação do doente e informação clínicas. Permite a identificação de interações medicamentosas, problemas de adesão, doses incomuns, interações com alimentos, problemas de eficácia, reações adversas, problemas com medicamentos não sujeitos a receita médica, necessidade adicional de terapêutica e medicação desnecessária, problemas de dose.

In spite of being a service that can enhance the pharmacists' role in the health system, the implementation of medication reviews has not been thoroughly achieved. Major barriers to implement an effective medication review service cited in the literature have been lack of time, collaboration with physicians, pharmacists' self-confidence, and patient inclusion (11,12). Therefore, there is a need to enhance the efficiency of medication review services. The use of IT may unlock this potential efficiency (13), allowing more time to augment medication review provision and the development of new services.

nos idosos, através da identificação de medicamentos para os quais os riscos do seu uso superam os benefícios (10).

Apesar da revisão terapêutica ser um serviço que pode enfatizar o papel do farmacêutico no sistema de saúde, a sua implementação não foi totalmente alcançada. As principais barreiras citadas na literatura para implementar um serviço eficaz de revisão terapêutica têm sido a falta de tempo, a colaboração com médicos, a baixa autoconfiança dos farmacêuticos e a inclusão de doentes (11,12). Assim, torna-se necessário aumentar a eficiência do serviço de revisão terapêutica. O uso da Tecnologias da Informação pode desbloquear este

The inception of the Digital Age in the 1960s, with the development of electronics, information technology (IT) and automated production, has shaped the practice of pharmacy (14). Nowadays, community pharmacy practice is highly computerized, collecting patient information on a continuous basis and creating a permanently updated electronic healthcare record (EHR) (15). Electronic healthcare records provide real-time access to patient information, such as the patient's medical condition, visits to healthcare providers, and images and reports of diagnostic procedures, thus enabling a complete longitudinal record of evidence-based care (15). These EHR can impact decision-making, how healthcare professionals and patients interact with each other, how health information is stored and used, and how patients manage their health themselves through electronic apps and devices (16).

For community pharmacists, EHRs facilitate medication reviews and the identification of drug therapy problems (16). Structured methods and appropriate software are important tools to increase pharmacist effectiveness and improve health outcomes (17,18). Databases, that store patients' electronic records can be queried using search algorithms, for example, to select non-adherent patients or patients receiving specific medications (17), or to identify inpatients at risk of drug-related problems (19). Algorithms are known to support medication review processes identifying and discontinuing potentially inappropriate medications, which may otherwise lead older population to harmful events (20). Algorithms are liable to be automated and therefore able to support a continuous, reproducible, and less time-consuming medication review (21).

However, the definition of an algorithm tailored to the Portuguese pharmacies' information system is lacking. In order to design an algorithm, criteria must be defined based on the variables available on patient information of electronic records. Therefore, the aim of this study was to apply a type 1 medication review to a sample of patients' electronic medication records of a community pharmacy. This medication review will then enable the identification of clusters of patients in need of additional pharmacy professional interventions, a first step toward the design of a new decision algorithm.

potencial de eficiência (13), proporcionando ganhos de tempo com aumento da oferta deste serviço e desenvolvimento de novos serviços.

O início da Era Digital na década de 1960, marcada pelo desenvolvimento da eletrónica, da tecnologia da informação e da produção automatizada, moldou a prática da farmácia (14). Hoje em dia, a prática da farmácia comunitária está fortemente informatizada, recolhendo informações do doente de forma contínua e criando registos eletrónicos de saúde permanentemente atualizados (15). Os registos eletrónicos de saúde permitem o acesso em tempo real aos dados do doente, como patologias, visitas a profissionais de saúde, imagens e relatórios de diagnóstico, possibilitando um registo longitudinal completo dos cuidados de saúde prestados (15). Estes registos eletrónicos de saúde podem afetar a tomada de decisão, a forma como profissionais de saúde e doentes interagem uns com os outros, como as informações de saúde são armazenadas e usadas e como os doentes gerem a sua própria saúde através de aplicativos ou dispositivos eletrónicos (16).

Para o farmacêutico comunitário, os registos eletrónicos de saúde facilitam as revisões terapêuticas e a identificação de PRM (16). Métodos estruturados e softwares apropriados são ferramentas importantes para aumentar a efetividade do farmacêutico e melhorar os resultados em saúde (17,18). As bases de dados, que armazenam os registos eletrónicos de saúde, podem ser consultadas usando algoritmos de pesquisa, por exemplo, para selecionar doentes não aderentes ou doentes que recebem medicamentos específicos (17), ou para identificar doentes internados com risco de PRM (19). Os algoritmos são conhecidos por apoiar os processos de revisão terapêutica, identificando e descontinuando medicamentos potencialmente inadequados, que colocam a população idosa em risco (20). Os algoritmos são passíveis de automatização e, portanto, capazes de suportar a revisão terapêutica que se pretende contínua, reproduzível e menos demorada (21).

No entanto, falta a definição de um algoritmo adaptado ao sistema informático das farmácias portuguesas. De forma a desenhar um algoritmo, é necessário definir os critérios a utilizar com base na informação do doente disponível no registo eletrónico. Assim, o objetivo deste estudo foi aplicar uma revisão terapêutica do tipo 1 a uma amostra de registos eletrónicos de medicamentos de doentes de uma farmácia comunitária. Esta revisão terapêutica permitirá, então, a identificação de *clusters* de doentes que precisam de intervenções farmacêuticas adicionais, sendo este um primeiro passo para o projeto de um novo algoritmo de decisão.

## Materials and Methods

An exploratory retrospective observational study was conducted performing a type 1 medication review to electronic patient records. A convenience sample was used, extracted from the database of electronic medication records of a community pharmacy located in the district of Lisbon. The following inclusion criteria were used: records of continuous therapy in 12 months (June 2017-July 2018); use of two or more chronic prescription medications. Continuous therapy was defined as having records for medication dispensation fulfilling the expected duration of therapy without interruption.

To perform medication reviews, the criteria of necessity, effectiveness and safety of the 2nd Granada Consensus were applied (22). Drug safety was assessed with Sifarma™ software and included determination of interactions and contraindications, and respective level of severity. Degree of severity was classified as minor, moderate or major. Sifarma™ software enables to register and access patients' dispensing history, biomarkers, interactions, contraindications, and adverse reactions (23). Potentially inappropriate medications (PIM) were identified applying the Table 2 of Beers criteria 2015 (24), to patients over 65 years of age, classifying each drug as appropriate or inappropriate. This table lists potentially inappropriate medications for older adults outside the palliative care and hospice setting, including medications to avoid for many or most older adults, even in the absence of patient's diagnosis (25). These criteria were considered as not applicable for patients under 65 years old. Duplication of the same active substance or same therapeutic class was also identified. The Summary of Product Characteristics (SPC) of each medication was also consulted to identify the need for monitoring and which parameters to evaluate.

Statistical analysis of the data was performed using IBM SPSS version 22 and Microsoft Excel. Significance level was set to 5%. Non-parametric tests were performed because there was no normal distribution in all continuous variables. For categorical and ordinal variables, Spearman correlations and Chi-Square tests were used. Two-step cluster analysis was performed to identify the number of possible clusters within the sample. Patients had to sign an informed consent to have their record stored at the pharmacy, where consent was given to use anonymized data for research purposes. No further consent was deemed necessary.

## Material e Métodos

Este é um estudo exploratório, observacional e retrospectivo, cujo o objetivo foi realizar uma revisão terapêutica do tipo 1 em registos eletrónicos de doentes. Foi utilizada uma amostra de conveniência, extraída da base de dados de uma farmácia comunitária localizada no distrito de Lisboa. Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: histórico de terapêutica contínua em 12 meses (entre junho de 2017 a julho de 2018) e utilização de dois ou mais medicamentos crónicos. O histórico de terapêutica contínua foi definido como a existência de registos de dispensa de medicamentos que cumprem com a duração esperada da terapêutica sem qualquer interrupção.

Para realizar a revisão terapêutica, foram aplicados os critérios de necessidade, eficácia e segurança do 2º Consenso de Granada (22). A segurança dos medicamentos foi avaliada com o software Sifarma™ e incluiu a determinação de interações e contraindicações, e respetivo nível de gravidade. O grau de gravidade foi classificado como ligeiro, moderado ou grave. O software Sifarma™ permite registar e aceder ao histórico de dispensa, biomarcadores, interações, contraindicações e reações adversas dos doentes (23). Os medicamentos potencialmente inapropriados foram identificados aplicando-se a Tabela 2 dos critérios de Beers 2015 (24), para doentes com mais de 65 anos de idade classificando cada medicamento como apropriado ou inapropriado. Esta tabela lista os medicamentos potencialmente inadequados para idosos fora do ambiente de cuidados paliativos e lares, incluindo medicamentos a serem evitados para muitos ou a maioria dos idosos, mesmo na ausência de registo do diagnóstico (25). Para doentes com menos de 65 anos, esses critérios foram considerados não aplicáveis. Também foi identificada duplicação da mesma substância ativa ou mesma classe terapêutica. O Resumo das Características do Medicamento (RCM) de cada medicamento foi igualmente consultado para identificar a necessidade de monitorização de biomarcadores e que parâmetros avaliar.

A análise estatística dos dados foi realizada no IBM SPSS versão 22 e Microsoft Excel. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Foram realizados testes não paramétricos, pois não houve distribuição normal em todas as variáveis contínuas. Para variáveis categóricas e ordinais, foram utilizadas correlações de Spearman e testes de Qui-quadrado. A análise de *clusters* em duas fases foi realizada para identificar o número de *clusters* possíveis na amostra. Os doentes tiveram de assinar um

termo de consentimento livre e esclarecido para que seus registros fossem armazenados na farmácia, onde foi dado consentimento para o uso de dados anônimos para fins de pesquisa. Nenhum consentimento adicional foi considerado necessário.

## Results

The final sample of electronic records eligible for type 1 medication review included 55 patients. 54.5% were female and 45.5% were male. Mean age of the sample was 65.67 years (SD 14.8) with a median of 68 years [IQR: 55.0 – 77.0]. Age had a normal distribution in women but not in men (Shapiro-Wilk;  $p = 0.634$  women;  $p = 0.017$  men). In this sample, men were on average older than women, but the differences were not significant (Mann-Whitney;  $p = 0.076$ ) (Table 2). The age variable was then categorized with a cut-off in the Beers criteria ( $< 65$  years;  $\geq 65$  years).

The results revealed that 58.1% of patients in the sample went to the pharmacy at least once a month. Differences between genders in frequency of pharmacy visits were not significant ( $p = 0.313$ ). Despite the positive correlation with age, in this sample, differences between age groups and their visit frequency were also not significant (Chi-square;  $p = 0.453$ ).

A total of 289 drugs were analysed. The median number of drugs used per patient was 5.0 [IQR: 3.0 – 7.0]. As the variable “number of drugs” had no normal distribution (Shapiro-Wilk;  $p < 0.0001$ ), a new variable was categorized considering the median and using the numerical category most often used in polypharmacy literature - 5 or more drugs (26). With this new variable, it was found that 43.6% of patients used 4 drugs or less, and 56.4% used 5 or more drugs. No differences were identified in the number of drugs between genders (Mann-Whitney;  $p = 0.725$ ) (Table 2). Age had a positive correlation with the patient's total number of medications (Spearman's coefficient = 0.345,  $p = 0.010$ ).

Type 1 medication review showed that 87.3% of patients in the studied sample had at least one medical condition with measurable biomarkers, such as hypertension, diabetes, dyslipidaemia, or asthma. All participants over 65 years of age had one of these medical conditions ( $p = 0.001$ ), but having measurable biomarkers was not associated with the number of medications taken (Mann-Whitney;  $p = 0.279$ ). Concerning 2015 Beers criteria, 18.2% of the sample population was found to

## Resultados

A amostra final de registros eletrônicos elegíveis para revisão terapêutica do tipo 1 incluiu 55 doentes. Destes 54,5% eram mulheres e 45,5% homens. A média de idade da amostra foi de 65,67 anos (DP 14,8) com mediana de 68 anos [IQR: 55,0 – 77,0]. A idade teve distribuição normal nas mulheres, mas não nos homens (Shapiro-Wilk;  $p = 0,634$  mulheres;  $p = 0,017$  homens). Nesta amostra, os homens eram em média mais velhos do que as mulheres, mas as diferenças não foram significativas (Mann-Whitney;  $p = 0,076$ ) (Tabela 2). A variável idade foi então categorizada com um ponto de corte nos critérios de Beers ( $< 65$  anos;  $\geq 65$  anos).

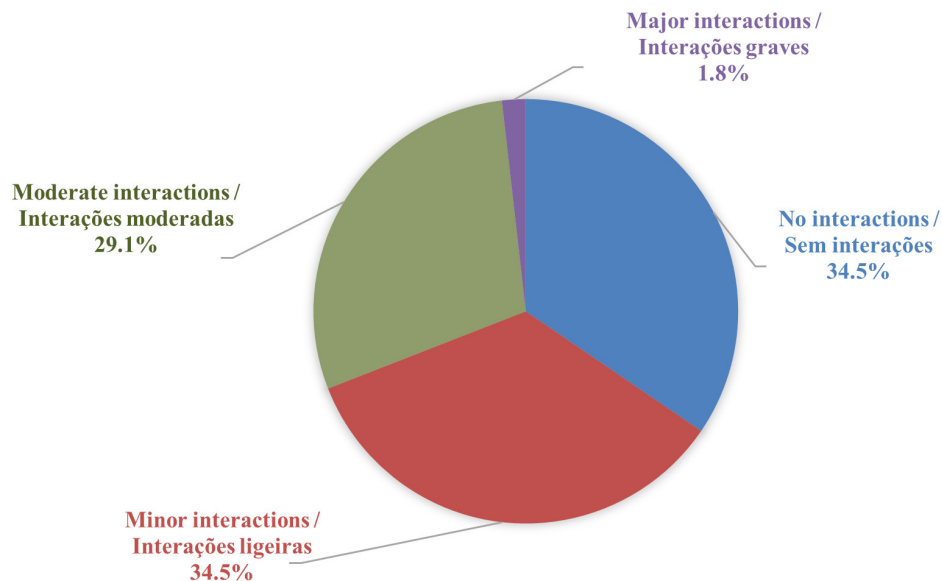
Observou-se que 58,1% dos doentes da amostra visitou a farmácia pelo menos uma vez por mês. As diferenças entre gênero na frequência de visitas à farmácia não foram significativas ( $p = 0,313$ ). Apesar da correlação positiva com a idade, as diferenças entre as faixas etárias e a frequência de visitas também não foram significativas ( $p = 0,453$ ).

Um total de 289 medicamentos foi analisado. A mediana do número de medicamentos usados por cada doente foi de 5,0 [IQR: 3,0 - 7,0]. Como a variável “número de medicamentos” não teve distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p < 0,0001$ ), uma nova variável foi categorizada recorrendo à categoria numérica mais utilizada na literatura de polifarmácia - 5 ou mais medicamentos (26). Com esta nova variável, verificou-se que 43,6% dos doentes usavam 4 medicamentos ou menos e 56,4% usavam 5 ou mais medicamentos. Não foram identificadas diferenças entre gêneros quanto ao número de medicamentos (Mann-Whitney;  $p = 0,725$ ) (Tabela 2). A idade apresentou uma correlação positiva com o total de medicamentos do doente (coeficiente de Spearman = 0,345,  $p = 0,010$ ).

A revisão terapêutica tipo 1 revelou que 87,3% dos doentes nesta amostra tinham pelo menos uma patologia com biomarcadores mensuráveis, como hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia ou asma. Todos os participantes com mais de 65 anos apresentavam uma destas patologias ( $p = 0,001$ ) mas ter biomarcadores mensuráveis não estava associado ao número de

**Table 2** - Dependent variable distribution by gender and age group**Tabela 2** - Distribuição das variáveis dependentes por sexo e grupo etário

	Gender / Género		Age group / Grupo Etário	
	Female / Feminino	Male / Masculino	< 65 years / anos	≥ 65 years / anos
N (%)	30 (54.5%)	25 (45.5%)	22 (40.0%)	33 (60.0%)
Mean age (SD) / Média da Idade (DP)	62.6 (14.8)	69.4 (12.4)	51.1 (8.5)	75.4 (6.5)
Median of medicines used (IQR) / Mediana do número de medicamentos usados (IQR)	4.5 (3.0 – 7.3)	5.0 (3.5 – 6.5)	4.0 (3.0 – 5.0)	5.0 (3.0 – 8.5)
Frequency of pharmacy visits / Frequência de visitas à farmácia				
< 5 visits per year / visitas por ano	2 (6.7%)	2 (8.0%)	2 (9.1%)	2 (6.1%)
6-12 visits per year / visitas por ano	12 (40.0%)	7 (28.0%)	10 (45.5%)	9 (27.3%)
13-23 visits per year / visitas por ano	10 (33.3%)	14 (56.0%)	7 (31.8%)	17 (51.5%)
>24 visits per year / visitas por ano	6 (20.0%)	2 (8.0%)	3 (13.6%)	5 (15.2%)

**Figure 1** - Frequency of medication interactions based on level of severity (n=55)**Figura 1** - Frequência das interações segundo o grau de gravidade (n = 55)

take inappropriate drugs. Gender differences in Beers criteria were not significant ( $p = 0.148$ ), yet a positive correlation between the number of drugs and the Beers criteria was found (Spearman coefficient 0.322;  $p = 0.017$ ). When analysing drug interactions, 30.9% were found to have moderate or major interaction potential. Figure 1 shows the distribution of degrees of severity of drug interactions. No differences in the degree of severity of interaction were observed between the age groups ( $p=0.388$ ), between genders ( $p=0.681$ ), or patients with or without measurable biomarkers ( $p =$

medicamentos consumidos (Mann-Whitney;  $p = 0,279$ ).

Em relação aos critérios de Beers de 2015, identificou-se que 18,2% da amostra apresentava medicamentos inapropriados. As diferenças de género nos critérios de Beers não foram significativas ( $p = 0,148$ ), mas uma correlação positiva entre o número de medicamentos e estes critérios foi encontrada (coeficiente de Spearman 0,322;  $p = 0,017$ ).

Ao analisar as interações medicamentosas, verificou-se que 30,9% apresentavam um potencial de interação

0.841). However, as with the Beers criteria, a positive correlation was found between the number of drugs and the severity degree of interactions (Spearman coefficient 0.671;  $p < 0.001$ ). The more medications one uses, the greater the likelihood of serious interactions. Another positive correlation was found between the severity of the interactions and Beers criteria (Spearman's coefficient = 0.343,  $p = 0.010$ ), which means that patients with Inappropriate Beers criteria had also a higher likelihood of using medications with moderate or major interactions.

Multicollinearity was also assessed. The highest Variance inflation factor (VIF) was 2.58 for age and number of medications. The literature considers this value to be an acceptable value, indicative of low multicollinearity. After the descriptive analysis, to uncover possible patient clusters in this sample we performed a two-step cluster analysis. Considering the statistical analysis, the variables included in the model for the two-step cluster analysis were severity degree of interactions, severity degree of contraindications, Beers criteria, number of drugs used and medical condition with measurable biomarkers.

Four clusters and one outlier patient were identified, with the characteristics presented in Table 3. Figure 2 details the importance of the variables in the model. These clusters allowed to identify the proportion of patients who could benefit from different pharmaceutical interventions and their degree of urgency or priority.

## Discussion

In this study, a type 1 medication review was performed using a sample of patients' EHRs within a community pharmacy database. This review enabled the identification of patient clusters. These clusters led us to propose different pharmaceutical interventions suitable to the perceived associated risk. For instance, two clusters (2 and 3), representing 36.3% of patients, could benefit from a type 2A review, while another cluster (cluster 4) comprising 30.9% of patients would only need to measure their biomarkers to assess the

moderado ou grave. A Figura 1 mostra a distribuição dos graus de gravidade das interações medicamentosas. Não foram observadas diferenças no grau de gravidade da interação entre os grupos etários ( $p = 0,388$ ), sexo ( $p = 0,681$ ) ou doentes com ou sem biomarcadores mensuráveis ( $p = 0,841$ ). Contudo, tal como nos critérios de Beers, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de medicamentos e o grau de gravidade das interações (coeficiente de Spearman 0,671;  $p < 0,001$ ). Quanto mais medicamentos se usa, maior a probabilidade de interações graves. Outra correlação positiva foi encontrada entre a gravidade das interações e os critérios de Beers (coeficiente de Spearman = 0,343,  $p = 0,010$ ), ou seja, os doentes com medicamentos inapropriados apresentaram maior probabilidade de usar medicamentos com interações moderadas ou graves.

A multicolinearidade foi também avaliada. O maior Fator de Inflação de Variância obtido foi para a variável idade com o número de medicamentos (VIF=2,58). A literatura considera este um valor aceitável, indicativo de baixa multicolinearidade. Após a análise descritiva, e de forma a encontrar os possíveis *clusters* de doentes nesta amostra, foi realizada uma análise de *cluster* em duas etapas (*two-step cluster analysis*). As variáveis incluídas no modelo para a análise de *cluster* em duas etapas foram: grau de gravidade das interações, grau de gravidade das contraindicações, critérios de Beers, número de medicamentos usados e biomarcadores mensuráveis.

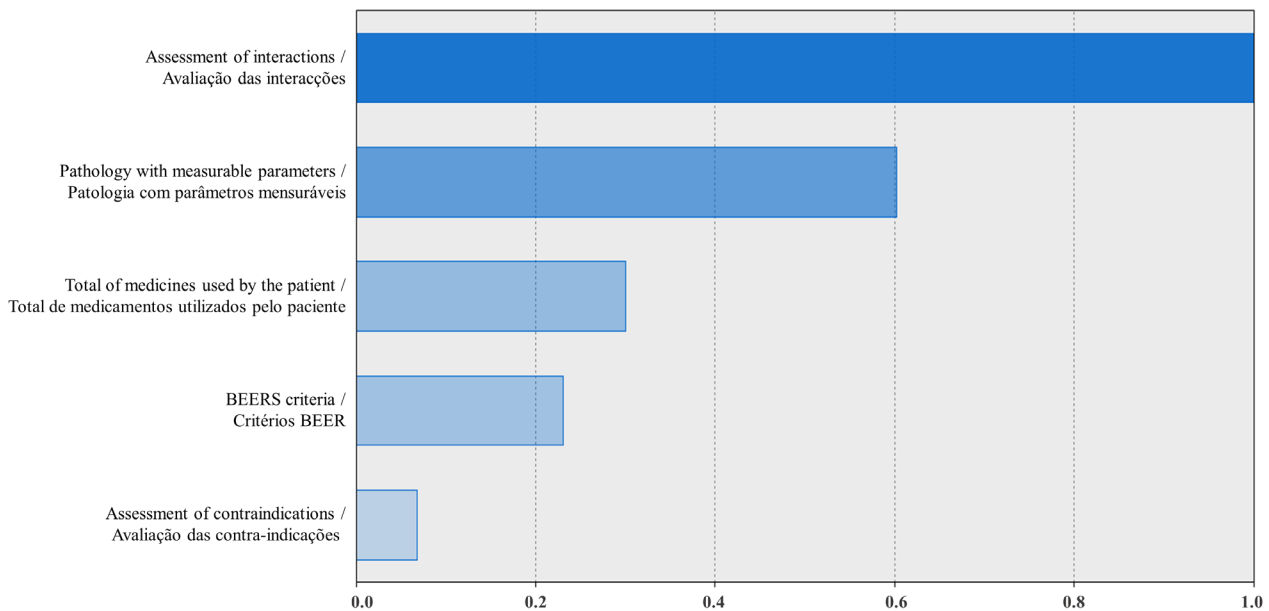
Foram identificados quatro *clusters* e um doente *outlier*, com as características apresentadas na Tabela 3. A Figura 2 detalha a importância das variáveis no modelo. A análise de *clusters* permitiu, assim, identificar a proporção de doentes que poderia beneficiar de uma intervenção farmacêutica diferente e o seu grau de urgência ou prioridade.

## Discussão

Neste estudo, realizou-se uma revisão terapêutica tipo 1 usando uma amostra de registos eletrónicos de doentes de uma base de dados de farmácia comunitária. Esta revisão permitiu a identificação de *clusters* de doentes. Para cada *cluster* de doentes podem ser propostas diferentes intervenções farmacêuticas de acordo com a perceção do risco associado. Por exemplo, dois *clusters* (2 e 3), representando 36,3% dos doentes, poderiam beneficiar de uma revisão do tipo 2A, enquanto outro *cluster* (4), compreendendo 30,9% dos doentes,

**Table 3 - Clusters identified and their characteristics (n=55)**  
**Tabela 3 - Clusters identificados e suas características (n = 55)**

Cluster	N (%)	Criteria	Crítérios
1	17 (30.9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Minor interactions (100%)</li> <li>Medical condition with measurable biomarkers (100%)</li> <li>Medicines used (Median; [IQR]): 5.0; [4.0-6.0]</li> <li>Beers Criteria: Not applicable (41.2%); appropriate (35.3%); inappropriate (23.5%)</li> <li>No contraindications (70.6%); minor (23.5%); moderate (5.9%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interações ligeiras (100%)</li> <li>Condição médica com biomarcadores mensuráveis (100%)</li> <li>Medicamentos usados (mediana; [IQR]): 5,0; [4,0-6,0]</li> <li>Crítérios de Beers: Não aplicável (41,2%); apropriado (35,3%); impróprio (23,5%)</li> <li>Sem contraindicações (70,6%); ligeiras(23,5%); moderadas (5,9%)</li> </ul>
2	12 (21.8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Moderate interactions (100%)</li> <li>Medical condition with measurable biomarkers (100%)</li> <li>Medicines used (Median; [IQR]): 8.0; [5.0-10.0]</li> <li>Beers Criteria - appropriate (58.3%); Inappropriate (41.7%)</li> <li>No contraindications (50.0%); minor (16.7%); moderate (33.3%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interações moderadas (100%)</li> <li>Condição médica com biomarcadores mensuráveis (100%)</li> <li>Medicamentos usados (mediana; [IQR]): 8,0; [5,0-10,0]</li> <li>Crítérios de Beers - apropriado (58,3%); Inapropriado (41,7%)</li> <li>Sem contraindicações (50,0%); ligeiras(16,7%); moderadas (33,3%)</li> </ul>
3	8 (14.5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No interactions (25.0%); minor (25.0%); moderate (50.0%)</li> <li>Medical condition without measurable biomarkers (87.5%); with measurable biomarkers (12.5%)</li> <li>Medicines used (Median; [IQR]): 4.0; [3.0-6.5]</li> <li>Beers Criteria: not applicable (100%)</li> <li>No contraindications (87.5%); moderate (12.5%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sem interações (25,0%); ligeiras (25,0%); moderadas (50,0%)</li> <li>Condição médica sem biomarcadores mensuráveis (87,5%); com biomarcadores mensuráveis (12,5%)</li> <li>Medicamentos usados (mediana; [IQR]): 4,0; [3,0-6,5]</li> <li>Crítérios de Beers: não aplicável (100%)</li> <li>Sem contraindicações (87,5%); moderadas (12,5%)</li> </ul>
4	17 (30.9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No interactions (100%)</li> <li>Medical condition with measurable biomarkers (100%)</li> <li>Medicines used (Median; [IQR]): 3.0; [2.0-4.0]</li> <li>Beers Criteria: not applicable (47.1%); Appropriate (52.9%)</li> <li>No contraindication (94.1%); minor (5.9%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sem interações (100%)</li> <li>Condição médica com biomarcadores mensuráveis (100%)</li> <li>Medicamentos usados (mediana; [IQR]): 3,0; [2,0-4,0]</li> <li>Crítérios de Beers: não aplicável (47,1%); Apropriado (52,9%)</li> <li>Sem contraindicações (94,1%); ligeiras (5,9%)</li> </ul>
Outlier	1 (1.8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Major interactions</li> <li>Medical condition with measurable biomarkers</li> <li>Medicines used: 7</li> <li>Beers Criteria: inappropriate</li> <li>Major contraindications</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interações graves</li> <li>Condição médica com biomarcadores mensuráveis</li> <li>Medicamentos usados: 7</li> <li>Crítérios de Beers: Inapropriado</li> <li>Contraindicações graves</li> </ul>



**Figure 2 - Variables used in the model and their importance**  
**Figura 2 - Variáveis usadas no modelo e a sua importância**

effectiveness of the therapy. The medication review also identified one high risk patient requiring an urgent type 2A medication review. The results showed that all of the patients in this sample could benefit from professional intervention beyond the basic medication dispensing service. Our analysis showed that while 69% could benefit from more advanced interventions, simple interventions already integrated in day-to-day pharmacy practice would be suitable for 31% of patients. These services are low-cost, and have the potential to yield a high degree of patient engagement and satisfaction, critical for a successful longitudinal provision of services (27). The high frequency of visits to the pharmacy (1 to 2 times a month), especially in patients who use a higher number of chronic medications, gives community pharmacists the opportunity to provide such professional services without scheduling additional visits. This high frequency is common in the community setting and has been reported in other studies (28–30). Moreover, this high degree of patient-pharmacist interaction represents opportunities to provide additional care. Consistent registration of biomarkers in the patient's electronic record would allow the assessment of the effectiveness of therapies, which our study could not characterize due to the absence of biomarker records. The quality of information held within patient medication records affects the efficiency of new service provided. With more accurate and complete records, the more patient-centered approaches can be taken, with reduced duplication of effort (31).

The main causes of DRP assessed were related to safety – drug interactions, contraindications, and drug appropriateness. DRP identification is one of the first steps in therapeutic optimization, followed by its classification and resolution by the pharmacist or prescriber. As the four cluster model shows, the most important factor in cluster creation was drug interactions. This finding led us to consider the outlier patient as a high risk patient that was undetected at the time of dispensation of medication but in urgent need of a type 2A medication review. The use of Sifarma™ software in the medication review proved to be useful, as it adds a degree of severity to the causes of DRPs, helping to prioritize patients and define the professional intervention of the pharmacists most suited to them.

precisaria apenas de medir os seus biomarcadores viabilizando assim a avaliação da efetividade da terapêutica. Além disso, a revisão terapêutica identificou um doente de alto risco, exigindo uma revisão urgente do tipo 2A. Os resultados mostraram que praticamente todos os doentes desta amostra poderiam beneficiar de outra intervenção profissional além do serviço de dispensa de medicamentos. A nossa análise mostra que cerca de 69% dos doentes requerem uma intervenção avançada, enquanto 31% dos doentes seriam elegíveis para intervenções simples já integradas na prática farmacêutica. Esses serviços são de baixo custo, mas têm o potencial de gerar um elevado grau de envolvimento e satisfação do doente, essenciais para uma prestação de serviços longitudinal bem-sucedida (27). A elevada frequência de visitas à farmácia (1 a 2 vezes por mês), principalmente dos doentes que usam um maior número de medicamentos crônicos, dá aos farmacêuticos comunitários a oportunidade de prestar serviços profissionais sem agendamento de consultas adicionais. Essa elevada frequência é comum em ambulatório e também foi encontrada em outros estudos (28–30). Além disso, esse elevado grau de interação farmacêutico-doente possibilita a prestação de cuidados adicionais. O registo consistente de biomarcadores no registo eletrónico do doente permitiria avaliar a eficácia da terapia, que o nosso estudo não pode caracterizar devido à ausência de registos desses biomarcadores. A qualidade da informação mantida nos registos eletrónicos do doente afeta a eficiência da prestação de novos serviços, pois quanto mais precisos e completos forem, mais abordagens focadas nos doentes podem ser realizadas e com menor duplicação de esforços (31).

As principais causas de PRM avaliadas foram relacionadas com a segurança - interações medicamentosas, contraindicações e adequação dos medicamentos. A identificação de PRM é uma das primeiras etapas na otimização terapêutica seguida da sua classificação e resolução pelo farmacêutico ou prescritor. Como mostra o modelo de quatro *clusters*, o fator mais importante para decidir a integração em determinado grupo foram as interações medicamentosas. Esta observação levou-nos a considerar o doente *outlier* como representando doentes de alto risco que não foram sinalizados no momento da dispensa, e que beneficiariam de uma revisão terapêutica tipo 2A urgente. O uso do software Sifarma™ mostrou-se útil na revisão terapêutica, pois associa o grau de gravidade às causas de PRM, auxiliando na priorização dos doentes e na definição da intervenção profissional da farmácia mais adequada.



Among the barriers to implementation of new pharmacy services thoroughly identified in the literature, lack of time is constantly cited as one of the most important (11,12). To overcome this barrier, Information Technologies would be a very welcome tool (13). Hence, the need to use an algorithm to identify patients for advanced interventions, integrating a new customer relationship service in the pharmacy workflow without massive disruption, is evident. Having an automated algorithm able to find such patients that would complement current information systems would be an obvious benefit for any pharmacy and pharmacist. In order to help pharmacists in the provision of medication reviews without increasing workload, full automation of type 1 medication review is desirable. This non-clinical review addresses simple issues related to the medication to highlight more complex issues requiring other types of reviews or services. A computerised system based on an algorithm might support a less time-consuming, continuous, and reproducible type 1 medication review (18). The automation of a type 1 medication review involves screening the pharmacy database (from Sifarma™), identifying groups of patients based on predefined criteria, and the suggestion of a professional service. Nevertheless, the full automation of all types of medication reviews cannot be foreseen. No automation replaces pharmacist's assessment. However, accessibility to well-kept electronic patient records is essential for the use of queries and a starting point for criteria-based algorithms (18). Machine Learning, and its ability to use algorithms capturing complex, nonlinear relationships in data, could then make this goal more feasible and efficient (13). We consider that this study was a step in this direction. Future studies on this topic should focus on testing an automated algorithm based on the criteria here identified, assessing its validity, pertinence, and impact on the pharmacy practice. Its use in pharmacy daily practice will enable continuous improvements and more accurate outcome measurement.

This study presents some limitations that must be acknowledged. In spite of the low number of patients in the sample, we consider that it is relevant to show the potential use of the information and data available in the pharmacy's electronic records, since this information is collected consistently over time but remains untapped. However, the low number of patients in the sample hinders the extrapolation of the medication review results to the general population. The frequency and degree of contraindications and interactions are not generalizable. Moreover, most of the drugs targeted for review were solid oral dosage forms, but it is also

De entre as barreiras para implantação de novos serviços de farmácia amplamente identificadas na literatura, a falta de tempo é constantemente citada como uma das mais importantes (11,12). Para superar essa barreira, as tecnologias de informação serão uma ferramenta muito bem-vinda (13). Assim, consideramos evidente a necessidade de utilizar um algoritmo para identificar doentes para intervenções avançadas, integrando assim um novo serviço de relação com o cliente no fluxo de trabalho da farmácia sem grande interrupção. Dispor de um algoritmo automatizado capaz de sinalizar os doentes, complementando o sistema informático atual, constitui uma vantagem óbvia para qualquer farmácia e farmacêutico. A fim de ajudar os farmacêuticos na prestação de serviços sem aumentar a carga de trabalho, é desejável a automatização da revisão terapêutica do tipo 1. Esta revisão, não clínica, aborda questões simples relacionadas com a medicação evidenciando questões mais complexas para outro tipo de revisão ou serviço. Já existe evidência que um algoritmo informatizado pode suportar revisões terapêuticas menos demoradas, contínuas e reprodutíveis (18). A automatização da revisão terapêutica do tipo 1 envolve a triagem da base de dados da farmácia (Sifarma™), a identificação de grupos de doentes com base em critérios pré-definidos e a sugestão de um serviço profissional. No entanto, não é previsível a automatização de todos os tipos de revisões terapêuticas. Nenhuma automatização substitui a avaliação do farmacêutico. Já a acessibilidade aos registos eletrónicos dos doentes é essencial para o uso de queries e um ponto de partida para algoritmos baseados em critérios (21). Dessa forma, o recurso ao Machine Learning com a sua capacidade de usar algoritmos que capturam relações complexas e não lineares em bases de dados, pode viabilizar esse objetivo (13). Consideramos que este estudo foi um passo nessa direção. Estudos futuros sobre este tópico devem concentrar-se em testar um algoritmo automatizado baseado nos critérios aqui identificados, avaliando a sua validade, pertinência e impacto na prática farmacêutica. A sua utilização na prática diária da farmácia permitirá melhorias contínuas e uma medição mais precisa dos resultados.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Apesar do baixo número de doentes na amostra, consideramos relevante mostrar o potencial de utilização da informação e dados disponíveis nos registos eletrónicos da base de dados da farmácia, uma vez que essas informações são recolhidas de forma consistente ao longo do tempo, mas permanecem inexploradas. Contudo, o baixo número de doentes na amostra dificulta a extrapolação dos resultados da revisão de medicamentos para a população em geral.

necessary to pay attention to non-solid dosage forms. This may have an impact in determining the severity of interactions, since the software only identifies the drug interaction, leaving the assessment of its importance to the pharmacist. In addition, the identification of potentially inappropriate medications would have been more complete if there had been access to the respective patient's diagnosis, as has been noted in a previous study (25). Nevertheless, Lavrador *et al.* (25) found that although restricted access to patients' diagnoses may limit the judgement of Beers PIM-qualifying criteria, this limitation had no effect on the number of PIM identified. This finding confirms that the identification of PIM even without diagnostic information is feasible and should be performed.

The definition of clusters using two-step cluster analyses can also be questioned. Although this method is essentially descriptive and therefore adapted to the exploratory analysis here reported, part of the assumptions for its validity, namely the normal distribution of continuous variables, were not present. However, as the variables included were independent from each other, the categorical variables had a multinomial distribution, and there was a low multicollinearity degree assessed by the VIF, it is possible that, even if all the assumptions are not fully met, the resulting clusters are still valid (32). As the objective was to identify clusters in this sample, the results presented here can only be applied to the pharmacy where the study took place. The rationale for attributing pharmaceutical services to each cluster is also open for debate. Our choice was determined by our view of the medication review process, where type 1 medication review implies the identification of DRPs and making recommendations. The screening of the pharmacy database, the criteria that allow signalling the patients, an output that identifies the patient, the reasons for the signalling and the suggestion / recommendation of a professional service are the necessary cornerstones of a future intervention. Based on this output, the pharmacist must assess the situation, schedule the service and provide it, registering new information that will then feed into the algorithm, providing the basis for a "roundabout" strategy for customer loyalty as well as a contribution to the sustainability of the pharmacy. Future medication reviews using an automated algorithm in a larger set of pharmacies with a higher number of patients should validate the identified clusters.

A frequência e o grau de contraindicações e interações não são generalizáveis. Além disso, a maioria dos medicamentos alvo de revisão terapêutica eram formas farmacêuticas orais sólidas, mas também é necessário prestar atenção às formas farmacêuticas não sólidas. Isso pode ter impacto na determinação da gravidade das interações, uma vez que o *software* apenas identifica a interação medicamentosa, cabendo ao farmacêutico a avaliação da sua importância. No que respeita a identificação de medicamentos potencialmente inadequados (MPI) teria sido mais completa se houvesse acesso ao respetivo diagnóstico do doente, conforme citado em estudo anterior (25). No entanto, Lavrador *et al.* (25) verificaram que, embora a falta de acesso aos diagnósticos dos doentes possa limitar a aplicação dos critérios de qualificação de Beers, esta limitação não teve efeito no número de MPI identificados. Este resultado confirma que a identificação de MPI, mesmo sem diagnóstico, é viável e deve ser realizada.

A definição de *clusters* por meio da análise de *clusters* em duas fases pode também ser questionada. Apesar deste método ser essencialmente descritivo e por isso adaptado à análise exploratória aqui reportada, parte dos pressupostos para a sua validade, nomeadamente a distribuição normal das variáveis contínuas, não foram observados. Contudo, como as variáveis incluídas eram independentes, as variáveis categóricas tinham uma distribuição multinomial e houve um baixo grau de multicolinearidade avaliado pelo VIF, é possível que, mesmo que todos os pressupostos não sejam completamente cumpridos, os *clusters* resultantes continuem a ser válidos (32). Como o objetivo foi identificar *clusters* nesta amostra, os resultados aqui apresentados só podem ser aplicados na farmácia onde ocorreu o estudo. De igual forma, o racional para atribuir serviços farmacêuticos a cada *cluster* está aberta a debate. A sugestão de serviços apresentada foi determinada pela nossa visão do processo de revisão terapêutica, onde a revisão do tipo 1 implica a identificação de PRM, ou causas de PRM, e fazer recomendações que permitam a sua resolução. A triagem da base de dados da farmácia, os critérios que permitem sinalizar os doentes, um *output* que identifica o doente, os motivos da sinalização e a sugestão / recomendação de um serviço profissional são os pilares necessários para uma futura intervenção farmacêutica. Com base neste *output*, o farmacêutico deve avaliar a situação, agendar o serviço e prestá-lo, registrando nova informação que alimenta o algoritmo, fornecendo a base para uma estratégia de "carrossel" (i.e., ciclo contínuo de prestação de serviços farmacêuticos de acordo com as necessidades) para fidelizar o cliente e

## Conclusions

Current pharmacy practice generates a wealth of information regarding patients that is underused. To provide more and better professional services, community pharmacists need tools and systems that can analyse this information, processing data easily, quickly, and continuously.

The type 1 medication review conducted in the patients' electronic records of a pharmacy, using the Sifarma™ system, alerted to drug interactions and contraindications that, combined with the Beers criteria, allowed the identification of potential DRPs. The statistical analysis then allowed the grouping of patients into clusters, enabling their prioritization and subsequent suggestions of pharmaceutical interventions according to their health needs.

With current IT technology, we were able to identify patients who could benefit from professional pharmaceutical services, select the most appropriate intervention, and suggest their scheduling according to the frequency of the patients' visits to the pharmacy. Further studies will include the testing of a new IT tool to allow continuous screening of the pharmacy database to identify patients at risk who will benefit most from the professional services of the pharmacy. With an algorithm-based system and new pharmacy workflows, the ubiquitous barrier of lack of time can be overcome, enhancing the community pharmacist's ability to contribute to the quality use of medications.

## Authors Contributions Statement

LR, conceptualization and study design; MM and LL, experimental implementation; LR, MM, and JG, data analysis; LR and JG, drafting, editing and reviewing; LR, figures and graphics; JG, supervision and final writing.

também contribuir para sustentabilidade da farmácia. Futuras revisões terapêuticas usando um algoritmo automatizado num conjunto alargado de farmácias com um maior número de doentes permitirão validar os *clusters* identificados.

## Conclusões

A Farmácia de hoje tem uma riqueza de informação sobre seus utentes que está subutilizada. Para fornecer mais e melhores serviços profissionais, os farmacêuticos comunitários precisam de ferramentas e sistemas que analisem esses dados e processem a informação de forma fácil, rápida e contínua.

A revisão da medicação tipo 1 realizada nos registos eletrónicos dos doentes da farmácia usando o sistema Sifarma™ alertou para interações de medicamentos e contraindicações que conjugadas com os critérios de Beers, permitiu identificar potenciais PRM. A análise estatística realizada permitiu o agrupamento dos doentes em *clusters*, possibilitando a sua priorização e posterior definição de intervenções farmacêuticas em função das suas necessidades de saúde.

Com as tecnologias de informação atuais, pudemos identificar os doentes que podem beneficiar de serviços profissionais da farmácia, seleccionar a intervenção mais adequada e sugerir o seu agendamento de acordo com a frequência de visita do doente à farmácia. Os próximos desenvolvimentos consistirão em testar uma nova ferramenta informática que permita triagem contínua da base de dados da farmácia com a identificação dos doentes em risco que mais beneficiarão dos serviços profissionais da farmácia. Com um sistema baseado num algoritmo e novos fluxos de trabalho na farmácia, a barreira omnipresente da falta de tempo poderá ser superada, aumentando a capacidade de o farmacêutico comunitário contribuir para o uso correto, eficaz e seguro de medicamentos.

## Declaração sobre as contribuições do autor

LR, conceção e desenho do estudo; MM e LL, implementação experimental; LR, MM e JG, análise de dados; LR e JG, redação, edição e revisão; LR, figuras e gráficos; JG, supervisão e redação final.

## **Funding**

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

## **Acknowledgements**

The authors would like to express their thanks Farmácia Central do Cacém, Lda.

## **Conflict of Interests**

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

## **Financiamento**

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

## **Agradecimentos**

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos à Farmácia Central do Cacém, Lda.

## **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. Meraya, A. M., Raval, A. D., & Sambamoorthi, U. (2015). Chronic condition combinations and health care expenditures and out-of-pocket spending burden among adults, Medical Expenditure Panel Survey, 2009 and 2011. *Preventing Chronic Disease*, 12, E12. <https://doi.org/10.5888/pcd12.140388>.
2. Bodenheimer, T., Wagner, E. H., & Grumbach, K. (2002). Improving primary care for patients with chronic illness. *JAMA*, 288(14), 1775–1779. <https://doi.org/10.1001/jama.288.14.1775>.
3. Makowsky, M. J., Schindel, T. J., Rosenthal, M., Campbell, K., Tsuyuki, R. T., & Madill, H. M. (2009). Collaboration between pharmacists, physicians and nurse practitioners: a qualitative investigation of working relationships in the inpatient medical setting. *Journal of Interprofessional Care*, 23(2), 169–184. <https://doi.org/10.1080/13561820802602552>.
4. Cranor, C. W., Bunting, B. A., & Christensen, D. B. (2003). The Asheville Project: long-term clinical and economic outcomes of a community pharmacy diabetes care program. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington, D.C. : 1996)*, 43(2), 173–184. <https://doi.org/10.1331/108658003321480713>.
5. Hatah, E., Braund, R., Tordoff, J., & Duffull, S. B. (2014). A systematic review and meta-analysis of pharmacist-led fee-for-services medication review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(1), 102–115. <https://doi.org/10.1111/bcp.12140>.
6. Huiskes, V. J., Burger, D. M., van den Ende, C. H., & van den Bemt, B. J. (2017). Effectiveness of medication review: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Family Practice*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12875-016-0577-x>.
7. Pharmaceutical Care Network Europe Foundation (2012). PCNE statement on medication review 2011-2012.
8. Blenkinsopp, A., Bond, C., & Raynor, D. K. (2012). Medication reviews. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 74(4), 573–580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04331.x>.
9. Soares, M. A., Fernandez-Llimos, F., Cabrita, J., & Morais, J. (2011). Critérios de avaliação de prescrição de medicamentos potencialmente inapropriados: uma revisão sistemática [Tools to evaluate potentially inappropriate prescription in the elderly: a systematic review]. *Acta Medica Portuguesa*, 24(5), 775–784.
10. By the 2019 American Geriatrics Society Beers Criteria® Update Expert Panel (2019). American Geriatrics Society 2019 Updated AGS Beers Criteria® for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 67(4), 674–694. <https://doi.org/10.1111/jgs.15767>.
11. Niquille, A., Lattmann, C., & Bugnon, O. (2010). Medication reviews led by community pharmacists in Switzerland: a qualitative survey to evaluate barriers and facilitators. *Pharmacy Practice*, 8(1), 35–42. <https://doi.org/10.4321/s1886-36552010000100004>.
12. Coane, S., & Payne, R. (2016) Carrying out a structured medication review. *Prescriber* 27, 22–26. <https://doi.org/10.1002/psb.1426>
13. Gregório, J., & Cavaco, A. (2021). The pharmacist's guide to the future: Are we there yet?. *Research in Social & Administrative Pharmacy : RSAP*, 17(4), 795–798. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.05.029>
14. Baines, D., Nørgaard, L. S., Babar, Z. U., & Rossing, C. (2020). The Fourth Industrial Revolution: Will it change pharmacy practice?. *Research in Social & Administrative Pharmacy : RSAP*, 16(9), 1279–1281. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2019.04.003>.
15. Gulavani, S. S., & Kulkarni, R. V. (2010) Role of information technology in health care. *Proceedings of the 4th National Conference; INDIACOM-2010*.
16. Jackson, S., & Peterson, G. (2019). My Health Record: a community pharmacy perspective. *Australian Prescriber*, 42(2), 46–47. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2019.009>
17. van Boven, J. F., Stuurman-Bieze, A. G., Hiddink, E. G., Postma, M. J., & Vegter, S. (2014). Medication monitoring and optimization: a targeted pharmacist program for effective and cost-effective improvement of chronic therapy adherence. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 20(8), 786–792. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2014.20.8.786>.
18. de Wit, H. A., Mestres Gonzalvo, C., Hurkens, K. P., Mulder, W. J., Janknegt, R., Verhey, F. R., Schols, J. M., & van der Kuy, P. H. (2013). Development of a computer system to support medication reviews in nursing homes. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 35(5), 668–672. <https://doi.org/10.1007/s11096-013-9827-3>.
19. Roten, I., Marty, S., & Beney, J. (2010). Electronic screening of medical records to detect inpatients at risk of drug-related problems. *Pharmacy World & Science : PWS*, 32(1), 103–107. <https://doi.org/10.1007/s11096-009-9352-6>.
20. Poudel, A., Balloková, A., Hubbard, R. E., Gray, L. C., Mitchell, C. A., Nissen, L. M., & Scott, I. A. (2016). Algorithm of medication review in frail older people: Focus on minimizing the use of high-risk medications. *Geriatrics & Gerontology International*, 16(9), 1002–1013. <https://doi.org/10.1111/ggi.12589>.
21. Thiruchelvam, K., Wong, P. S., Kairuz, T., Babar, Z. U., & Hasan, S. S. (2018). Consolidated Medication Review Algorithm to Improve Medications Use in Older Adults: Components, Scoring Scheme, and Implementation. *Journal of the American Medical Directors Association*, 19(8), 717–718. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2018.03.007>.
22. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica (CTS131). Universidad de Granada; Grupo de Investigación en Farmacología Aplicada y Farmacoterapia (CTS259). Universidad de Sevilla; Grupo de Investigación en Farmacología (CTS164). Universidad de Granada (2002) Segundo consenso de Granada sobre problemas relacionados con medicamentos. *Ars Pharmaceutica*, 43(3-4): 179-187. <http://hdl.handle.net/10481/28237>
23. ANF - Sifarma Software. (2019) Manual da Componente Profissional - Sifarma 2000 Software.
24. By the American Geriatrics Society 2015 Beers Criteria Update Expert Panel (2015). American Geriatrics Society 2015 Updated Beers Criteria for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(11), 2227–2246.
25. Lavrador, M., Silva, A. A., Cabral, A. C., Caramona, M. M., Fernandez-Llimos, F., Figueiredo, I. V., & Castel-Branco, M. M. (2019). Consequences of ignoring patient diagnoses when using the 2015 Updated Beers Criteria. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 41(3), 751–756. <https://doi.org/10.1007/s11096-019-00828-0>.
26. Masnoon, N., Shakib, S., Kalisch-Ellett, L., & Caughey, G. E. (2017). What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatrics*, 17(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12877-017-0621-2>.
27. Gregório, J., Russo, G., & Lapão, L. V. (2016). Pharmaceutical services cost analysis using time-driven activity-based costing: A contribution to improve community pharmacies' management. *Research in Social & Administrative Pharmacy : RSAP*, 12(3), 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2015.08.004>.
28. Irish Pharmacy Union (2018). *Vision for community pharmacy in Ireland*. [https://ipu.ie/wp-content/uploads/2018/04/PwC\\_IPU-report.pdf](https://ipu.ie/wp-content/uploads/2018/04/PwC_IPU-report.pdf).
29. Boardman, H., Lewis, M., Croft, P., Trinder, P., & Rajaratnam, G. (2005). Use of community pharmacies: a population-based survey. *Journal of Public Health (Oxford, England)*, 27(3), 254–262. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdi032>.
30. Gregório, J., Cavaco, A. M., & Lapão, L. V. (2017). How to best manage time interaction with patients? Community pharmacist workload and service provision analysis. *Research in Social & Administrative Pharmacy : RSAP*, 13(1), 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2016.02.008>.
31. Wright, D. J., & Twigg, M. J. (2016). Community pharmacy: an untapped patient data resource. *Integrated Pharmacy Research & Practice*, 5, 19–25. <https://doi.org/10.2147/IPRP.S83261>
32. IBM. Clustering Principles. (2020) *IBM Knowledge Center* [www.ibm.com/support/knowledgecenter/pt/SSLVMB\_24.0.0/spss/tutorials/twostep\_methodology.html]

## Acceptability of kefir produced by fermentation of Portuguese milk with CIDCA AGK1 grains in a sample of Portuguese consumers

*Aceitabilidade do kefir produzido pela fermentação do leite português com grãos CIDCA AGK1 numa amostra de consumidores portugueses*

Emília Alves, Patrícia Rijo, Luís Monteiro Rodrigues, Catarina Rosado\*

CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376,  
1749-024 Lisbon, Portugal

\*corresponding author: catarina.rosado@ulusofona.pt

---

### Abstract

Fermented foods, such as kefir, tend to be characterized by their unique flavor and aroma. Sensory perception of this type of food or beverage is a key factor for the general consumer acceptance of the product, which can be assessed through sensory tests. Conventional sensory tests include acceptance tests where consumers, not trained panelists, are asked to express their degree of like on a hedonic scale, where the level of acceptability of foods does not require a choice between alternatives. The most commonly used scale for testing consumer acceptability of foods is the 9-point hedonic scale. An average score of 7 or higher on the acceptability test indicates a high sensory quality and represents a good acceptance of the product by the panel. This study aimed to evaluate the acceptance of a kefir drink in a sample of Portuguese consumers. The acceptability test of the kefir obtained by fermentation of Portuguese milk with CIDCA AGK1 kefir grains was conducted in a group of 19 consumers using a 9-point hedonic scale and produced a mean score of  $7.00 \pm 1.15$ , which correlates with a qualitative rating of “Like moderately.” This work is part of an ongoing study, designated DermalBio, conducted by our research center, with an aim to evaluate the benefits of kefir ingestion for cutaneous health.

**Keywords:** Kefir, fermented dairy, sensory perception, acceptability test, hedonic scale

---

### Resumo

Alimentos fermentados, como o kefir, tendem a ser caracterizados pelo seu sabor e aroma únicos. A percepção sensorial deste tipo de alimento ou bebida é um fator chave para a aceitação geral do produto pelo consumidor, e pode ser avaliada por testes sensoriais. Testes sensoriais convencionais incluem testes de aceitação, onde os consumidores, provadores não treinados, são solicitados a expressar o grau de preferência numa escala hedónica que não exige uma escolha entre alternativas. A escala mais vulgarmente usada para testar a aceitação de alimentos pelo consumidor é a escala hedónica de 9 pontos. Uma pontuação média igual ou superior a 7 no teste de aceitabilidade indica uma elevada qualidade sensorial e representa uma boa aceitação do produto pelo painel. Este estudo teve como objetivo avaliar a aceitação da bebida kefir numa amostra de consumidores portugueses. O teste de aceitabilidade do kefir, obtido pela fermentação de um leite português com grãos de kefir CIDCA AGK1, foi realizado num grupo de 19 consumidores usando uma escala hedónica de 9 pontos, produziu uma pontuação média de  $7,00 \pm 1,15$ , o que se correlaciona com uma avaliação qualitativa de “Moderadamente agradável”. Este trabalho enquadra-se num estudo in-use que pretende avaliar os benefícios da ingestão de kefir para a saúde cutânea, conduzido pelo nosso centro de investigação e codificado como DermalBio.

**Palavras-chave:** Kefir, leite fermentado, percepção sensorial, teste de aceitabilidade, escala hedónica

## Introduction

Kefir is a unique fermented, slightly carbonated, dairy beverage known for its organoleptic characteristics. It originated from the Caucasus, and has been traditionally consumed for centuries in several countries in Eastern Europe (1). Traditional production uses kefir grains as a natural starter, which differentiates this beverage from other fermented milk (2). Kefir can be made from different kinds of milk (cow, goat, sheep, camel, buffalo) and is characterized by an acid and slightly yeasty taste which, combined with the carbon dioxide produced by the yeast flora, confers a prickly sensation that can be considered as its typical flavor (3). Fermented foods, such as kefir, tend to be characterized by their unique flavor and aroma (3). Sensory perception of this type of food is a key factor for the general consumer acceptance of such products, and can be assessed by sensory tests (4,5). In the food industry, sensory evaluation methods used in dairy products include affective or consumers tests, among others (6). By definition, these tests are applied only to a naïve (untrained) panel, since trained panels are potentially more critical and more sensitive than the average consumer, thus ceasing to be considered a typical consumer assessment (4). Affective tests are used to assess consumer likes and dislikes, and the most typical are preference tests and acceptance tests (5,7). In preference tests, consumers are presented with several samples and are required to choose between them, that is, a preference must be indicated. In acceptance tests, also called degree of liking, consumers are asked to indicate the degree of liking on a scale where the degree of acceptability of foods does not require a choice between alternatives (4,7). The most commonly used scale for testing consumer acceptability of foods is the 9-point hedonic scale (8-12). This scale can be presented numerically or verbally, horizontally or vertically, although such structural variations have no critical effect on the results (13). It is a bipolar scale with four positive and four negative categories on each side of a neutral center. The hedonic scale uses the anchors like and dislike, thus assuming a continuum degree of affection in the consumers' preferences which can be categorized based on the like/dislike answers. This approach provides information on the product in a broader sense than a simple choice of yes or no (7,13). In rating scales, the selection of the anchor words must be meaningful and clear to the participants, must be related to the specific scale, and must prevent misinterpretation. Scoring in these scales is used with the main purpose of determining the magnitudes of the differences identified (14). In the 9-point hedonic scale, answers are usually assigned values between 1 and 9,

## Introdução

Kefir é uma bebida láctea fermentada, um pouco efervescente, conhecida pelas suas características organolépticas únicas, originária do Cáucaso e tradicionalmente consumida desde há séculos em vários países do Leste Europeu (1). A sua produção tradicional usa grãos de kefir como iniciador, o que diferencia esta bebida de outros leites fermentados (2). O kefir pode ser feito a partir de diferentes tipos de leite (vaca, cabra, ovelha, camelo, búfalo) e é caracterizado por um sabor ácido e levemente fermentado que, combinado com o dióxido de carbono produzido pelas leveduras, lhe confere uma sensação de efervescência e que pode ser considerado como o seu sabor típico (3). Alimentos fermentados, como o kefir, tendem a ser caracterizados pelo seu sabor e aroma únicos (3). A percepção sensorial, deste tipo de alimento é um fator chave para a aceitação destes produtos pelo consumidor em geral e pode ser avaliada por testes sensoriais (4,5). Na indústria alimentar, os métodos de avaliação sensorial usados em laticínios incluem, entre outros, testes afetivos ou de consumo. Por definição, estes são aplicados apenas a um painel ingênuo (não treinado), uma vez um painel treinado é potencialmente mais crítico e mais sensível do que o consumidor médio, deixando assim de ser considerado avaliação típica de consumidor (4). Testes afetivos são usados para avaliar o gosto/não gosto do consumidor, sendo os mais comuns, os testes de preferência e os testes de aceitação (5,7). Nos testes de preferência os consumidores são apresentados a várias amostras e são obrigados a escolher entre elas, ou seja, deve ser indicada uma preferência. Nos testes de aceitação, também denominados grau de gosto, os consumidores são solicitados a indicar o grau de gosto numa escala em que o grau de aceitabilidade dos alimentos não requer uma escolha entre alternativas (4,7). A escala mais comumente usada para testar a aceitação de alimentos pelo consumidor é a escala hedônica de 9 pontos (8-12). Esta escala pode ser apresentada numérica ou verbalmente, horizontal ou verticalmente embora tais variações estruturais não tenham efeito crítico sobre os resultados (13). É uma escala bipolar com quatro categorias positivas e quatro negativas de cada um dos lados de um centro neutro. A escala hedônica usa as palavras âncora gosto e não gosto, assumindo assim um grau contínuo de afeto das preferências do consumidor que pode ser categorizado com base nas respostas gosto/não gosto, fornecendo informações sobre o produto num sentido mais amplo, em vez de uma simples escolha de sim ou não (7,13). Nas escalas de avaliação, a seleção das palavras âncora deve ser significativa

where a value of 1 correlates with “dislike extremely” and a value of 9 with “like extremely”. Using this score, a mean value of 7 or higher is usually indicative of a high sensory quality, resulting in a good acceptance of the product (7, 15). When compared to other scaling methods, this scale is a robust way of estimating consumer like due to its simple yet sensitive categories of discriminating power. Its limited number of options also makes it suitable and easy to use for both trained or untrained panelists, thus justifying its wide acceptance (8,14,15). Therefore, when the primary objective of a study is to predict consumer acceptance, the 9-point hedonic scale has proven to be a simple and effective measuring device (8). Based on the fact that the consumption of kefir is not a typical food habit of the Portuguese population, this study aimed to evaluate the acceptance of this beverage in a sample of Portuguese consumers. This work is framed by a study regarding the cutaneous health benefits of kefir intake currently being conducted by our research team and designated as *DermapBio*.

## Materials and Methods

Kefir beverage was prepared by fermenting semi-skim ULHT Portuguese cow’s milk (purchased at a local supermarket) using CIDCA AGK1 kefir grains for 24 hours at 20 °C. CIDCA AGK1 kefir grains were obtained from the Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), La Plata, Argentina. The microbiological characterization of these grains has been described elsewhere (16-18). All volunteers were recruited from the *DermapBio* study conducted at our research centre, thus being a convenience sampling. Due to the fact that this work is part of an in-use study where kefir was consumed, we considered this an exploratory study. The study protocol was submitted to and approved by the ethics committee of the School of Sciences and Health Technologies at Lusofona’s University (Nº1/2018, 15th May 2018)

e clara para os participantes, deve estar relacionada com a escala específica e deve evitar interpretações erradas. A pontuação nessas escalas é utilizada com o objetivo principal de determinar as magnitudes das diferenças identificadas (14). Na escala hedónica de 9 pontos, atribuem-se geralmente às respostas valores entre 1 e 9, em que 1 se correlaciona com a categoria “extremamente desagradável” e 9 com a categoria “extremamente agradável”. Com esta pontuação, um valor médio de 7 ou superior é geralmente indicativo de uma qualidade sensorial elevada resultando numa boa aceitação do produto (7,15). Quando comparada com outros métodos de escalonamento, esta escala é uma forma robusta de estimar o gosto do consumidor devido às suas categorias simples, porém sensíveis, em termos de poder de discriminação. Também o seu número limitado de opções a tornam adequada e fácil de usar, seja por provadores treinados ou não treinados, justificando assim a sua ampla aceitação (8,13,15). Portanto, quando o objetivo principal de um estudo é prever a aceitação do consumidor, a escala hedónica de 9 pontos tem mostrado ser um instrumento de medição simples e eficaz (8). Atendendo ao facto do consumo de kefir não ser um hábito alimentar típico da população portuguesa, este estudo teve como objetivo avaliar a aceitação desta bebida numa amostra de consumidores portugueses. Este trabalho enquadra-se num estudo in-use que pretende avaliar os benefícios da ingestão de kefir para a saúde cutânea, conduzido pelo nosso centro de investigação e codificado como *DermapBio*.

## Material e Métodos

A bebida kefir foi preparada por fermentação de leite de vaca semidesnatado ULHT português (comprado num supermercado local) usando grãos de kefir CIDCA AGK1, durante 24 horas a 20 °C. Os grãos de kefir CIDCAAGK1 foram obtidos do Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), La Plata, Argentina. A caracterização microbiológica desses grãos foi descrita em outro lugar (16-18). Todos os voluntários foram recrutados a partir do estudo *DermapBio* realizado no nosso centro de investigação, sendo portanto, uma amostra de conveniência. Devido ao fato deste trabalho fazer parte de um estudo in-use, onde o kefir é consumido, este estudo foi considerado um estudo exploratório. O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética da Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona (Nº1 / 2018, 15 de maio de 2018) e foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração



and was conducted according to the principles of the Helsinki Declaration. The prepared kefir was evaluated by a consumer panel using 9-point hedonic scale. The consumer group consisted of 19 volunteers, 94.7% women and 5.3% men, aged 19 to 55 years (mean age  $29.11 \pm 11.61$  years). The volunteers had no prior experience with kefir consumption. All volunteers were given a white plastic cup with a sample (100 mL) of freshly made kefir, under controlled conditions, and then were asked to grade the beverage in a 9-point hedonic scale, where the acceptability of the product was evaluated within a score of 1 (dislike extremely) to 9 (like extremely), according to overall acceptability of the product. The scale was presented to the volunteers as a Google form questionnaire (Figure 1). Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as relative frequency (%), and association between variables was performed with Pearson's Chi-Square Test using SPSS statistical package version 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

de Helsínquia. O kefir preparado foi avaliado por um painel de consumidores usando uma escala hedónica de 9 pontos. O grupo de consumidores foi constituído por 19 voluntários, 94,7% mulheres e 5,3% homens, com idades entre 19 a 55 anos (média de idades  $29,11 \pm 11,61$  anos). Nenhum dos voluntários tinha provado kefir antes de participar neste estudo. Todos os voluntários receberam um copo de plástico branco com uma amostra (100 mL) de kefir acabado de fazer, sob condições controladas, e seguidamente foram solicitados a classificar a bebida numa escala hedónica de 9 pontos, onde a aceitabilidade do produto foi avaliada dentro de uma pontuação de 1 (extremamente desagradável) a 9 (extremamente agradável) de acordo com a aceitabilidade geral do produto. A escala foi apresentada aos voluntários na forma de questionário Google (Figura 1). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou como frequência relativa (%), e a associação entre variáveis foi realizada com Teste Qui-quadrado de Pearson usando o pacote estatístico SPSS versão 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

**Aceitabilidade do kefir**  
Avaliar a aceitabilidade do kefir  
\* Required

1. Código participante \*

---

2. De um modo geral, como avalia o kefir que tomou?  
Mark only one oval.

Extremamente agradável

Muito agradável

Moderadamente agradável

Ligeiramente agradável

Nem agradável nem desagradável, é indiferente

Ligeiramente desagradável

Moderadamente desagradável

Muito desagradável

Extremamente desagradável

**Figure 1** - 9-point hedonic scale translated in Portuguese language, presented as a questionnaire. The kefir consumed was evaluated by each (coded) participant as: dislike extremely [1], dislike very much [2], dislike moderately [3], dislike slightly [4], neither like nor dislike [5], like slightly [6], like moderately [7], like very much [8], or like extremely [9].

**Figura 1** - Escala hedónica de 9 pontos traduzida para a língua portuguesa, apresentada na forma de questionário. O kefir consumido foi avaliado por cada participante (codificado) como: extremamente desagradável [1], muito desagradável [2], moderadamente desagradável [3], ligeiramente desagradável [4], indiferente [5], ligeiramente agradável [6], moderadamente agradável [7], muito agradável [8], ou extremamente agradável [9].

## Results

The group of volunteers who participated in the study was characterized socio-demographically (Table 1). Within the study group, 78.9% were university students, 68.4% lived in an urban area, and the majority had no smoking habits (78.9%). The average Body Mass Index (BMI) of the sample was  $21.82 \pm 2.89$  kg/m<sup>2</sup>. The consumption of dairy products within the panel was mainly through the consumption of natural yogurt (84.2%), and 57.9% of the participants drank cow's milk regularly (Table 1). The results of the acceptability test using this 9-point hedonic scale showed that 58% of the volunteers assessed the kefir drink as "Like moderately", 32% as "Like very much" and only 11% assigned the rating "Dislike slightly" (Figure 2). The average score given by this sample of volunteers to our kefir was  $7.00 \pm 1.15$ , which is correlates with a "Like moderately" rating, and the acceptability of kefir was not related to the consumption of dairy products, namely, consumption of milk or yogurt ( $p = 0.310$  and  $p = 0.568$ , respectively).

## Discussion

Our results, correlated with a "Like moderately" rating, seem to indicate a reasonable acceptance of kefir by our panel. A classification such as ours can be an indicator of a high quality sensory product (13). Our results were consistent with those obtained by Moretti *et al.* (14), in which the acceptability of kefir made with CIDCA AGK1 grains, was also tested using untrained panelists ( $n=93$ ) and a 9-point hedonic scale. In their study, the average score obtained was  $7.88 \pm 0.35$  and this result was correlated with a qualitative grade of "Like very much", which indicated a good acceptance of the product by the panel (14).

The use of a 9-point hedonic scale has been widely accepted as a good tool to infer consumer acceptability as it is able to provide internal validity to the test (14). The use of this type of scale for assessment of consumer acceptability of dairy has been confirmed by other researchers (6,10,14). Nevertheless, some weak points have been identified, namely the small number of categories available, the lack of equal intervals between categories, the presence of the neutral category "neither like or dislike" that lessens the scale efficiency, and the general consumer tendency to avoid using the extreme categories, which may increase the scale vulnerability to ceiling effects (7,11,19). A consideration must be

## Resultados

O grupo de voluntários que participaram no estudo foi caracterizado sócio-demograficamente (Tabela 1). Cerca de 78,9 % eram estudantes universitários, 68,4 % viviam em área urbana e a maioria não tinha hábitos tabágicos (78,9 %). O Índice de Massa Corporal (IMC) médio da amostra foi de  $21.82 \pm 2.89$  kg/m<sup>2</sup> e o consumo de laticínios, no painel, foi principalmente devido ao consumo de iogurte natural (84,2 %) e 57,9 % dos participantes bebiam leite de vaca regularmente (Tabela 1). Os resultados do teste de aceitabilidade utilizando esta escala hedónica de 9 pontos mostraram que 58 % dos voluntários consideraram a bebida kefir como "Moderadamente agradável", 32 % como "Muito agradável" e apenas 11 % atribuíram a classificação de "Ligeiramente desagradável" (Figura 2). A pontuação média dada por esta amostra de voluntários ao nosso kefir foi de  $7,00 \pm 1,15$  o que equivale a uma classificação de "Moderadamente agradável," e a aceitabilidade do kefir não se relacionou com o consumo de laticínios, nomeadamente, consumo de leite ou iogurte ( $p = 0,310$  e  $p = 0,568$ , respectivamente).

## Discussão

Os nossos resultados, correlacionados com uma classificação de "Moderadamente agradável", parecem indicar uma aceitação razoável do kefir pelo nosso painel. Uma classificação como a nossa pode ser indicador de um produto sensorial de alta qualidade (13). Os nossos resultados foram consistentes com os obtidos por Moretti *et al.* (14), que testou a aceitabilidade de kefir feito a partir de grãos CIDCA AGK1, usando também provadores não treinados ( $n=93$ ) e uma escala hedónica de 9 pontos. No seu estudo, o score médio obtido foi de  $7,88 \pm 0,35$  e esse resultado foi correlacionado com uma classificação qualitativa de "Gosto muito", o que indicou uma boa aceitação do produto por parte dos consumidores (14).

O uso de uma escala hedónica de 9 pontos tem sido amplamente aceite como uma boa ferramenta para inferir sobre a aceitabilidade dos consumidores, uma vez que é capaz de fornecer validade interna ao teste (15). O uso deste tipo de escala para avaliação da aceitabilidade do consumidor de produtos lácteos foi confirmado por outros investigadores (6,10,14). No entanto, foram identificados alguns pontos fracos, nomeadamente o pequeno número de categorias disponíveis, a falta de intervalos iguais entre as categorias, a presença

**Table 1** - Sociodemographic characteristics of the sample of consumers.  
**Tabela 1** - Características sociodemográficas da amostra de consumidores.

Sociodemographic Characteristics / Características sociodemográficas	Portuguese consumers sample / Amostra de consumidores Portugueses (n=19)
Gender / Género	
Female / Feminino, n (%)	18 (94.7)
Male / Masculino, n (%)	1 (5.3)
Age / Idade, mean (SD) / média (DP), years / anos	29.11 (11.61)
Scholarity / Escolaridade	
High School (12th grade) / Ensino Secundário (12ºano), n (%)	16 (84.2)
Doctorate / Doutoramento, n (%)	3 (15.8)
Career / Profissão	
Professor / Professor, n (%)	3 (15.8)
University student / Estudante universitário, n (%)	15 (78.9)
Entrepreneur / Empresário, n (%)	1 (5.3)
Residence / Residência	
Urban / Urbano, n (%)	13 (68.4)
Rural / Rural, n (%)	6 (31.6)
Smoking habits / Hábitos tabágicos	
Non smoker / Não fumador, n (%)	15 (78.9)
Occasional smoker / Fumador ocasional, n (%)	3 (21.4)
Smoker / Fumador, n (%)	1 (7.1)
BMI / IMC, mean (SD) / média (DP), kg/m <sup>2</sup>	21.82 (2.89)
Dairy consumption / Consumo de laticínios	
Cow milk / Leite de vaca, n (%)	11 (57.9)
Natural yogurt / Iogurte natural, n (%)	16 (84.2)
Vegetable drink / Bebida vegetal, n (%)	5 (26.3)

SD – Standard Deviation / DP – Desvio Padrão; BMI – Body mass Index / IMC – Índice de Massa Corporal.

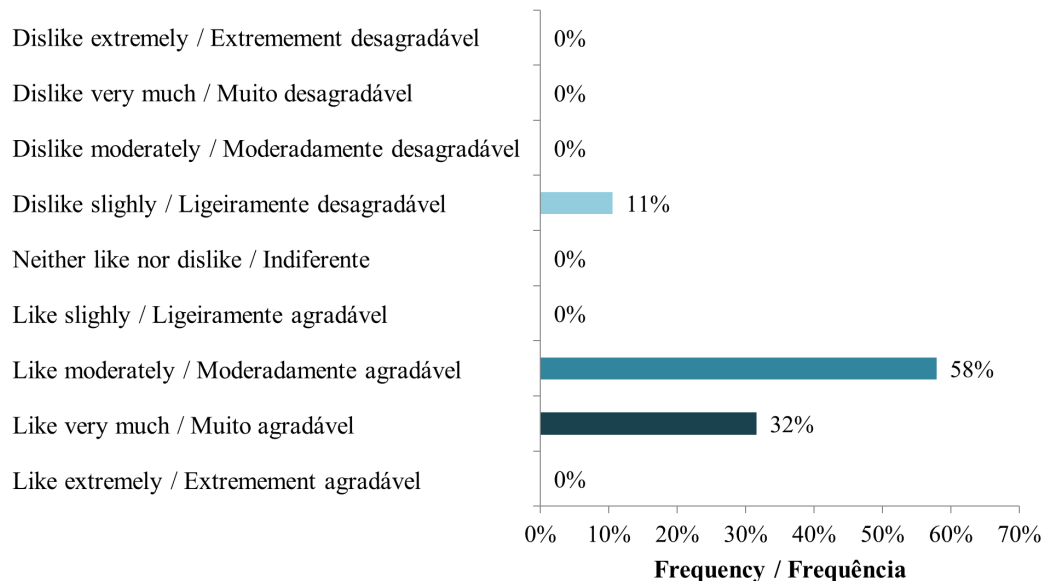
made about the use of a scale that was translated to Portuguese language. As demonstrated by Curia *et al.* (20) regarding the Spanish language, the use of the 9-point hedonic scale in languages different from English must be done with caution, as the general population may fail to perceive the translations with the same meaning as they have in English, especially with regard to the extreme categories of the scale (20). To the best of our knowledge, the translation of this scale into Portuguese has not yet been validated and, as such, care should be taken in generalizing the conclusions drawn. It should be noted that acceptance tests (consumer liking tests) should preferably be carried out with a larger number of individuals (6). Some authors recommend 50 consumers as the minimum desirable to guarantee the accuracy of the statistical analysis and to be able to draw conclusions product acceptance (not applicable to

da categoria neutra “nem gosto, nem não gosto” que diminui a eficiência da escala e a tendência geral do consumidor em evitar usar as categorias extremas, que podem aumentar a vulnerabilidade da escala aos efeitos de teto (7,11,19). Devemos ainda ter em consideração o facto de termos usado uma escala que foi traduzida para a língua portuguesa. Conforme demonstrado por Curia *et al.* (20) para a língua espanhola, o uso da escala hedónica de 9 pontos em outras línguas diferentes do inglês deve ser feito com cautela, pois a população em geral pode não perceber as traduções com o mesmo significado que elas possuem em inglês, especialmente no que diz respeito às categorias extremas da escala (20). Até onde sabemos, a tradução desta escala para a língua portuguesa ainda não foi validada e, como tal, devemos ter alguma precaução na generalização das conclusões tiradas. De notar que os testes de

trained tasters) (5,6,8). Furthermore, because we used a convenience sample of volunteers already willing to participate in a study involving kefir consumption for eight weeks, the main disadvantage of which is the lack of clear generalization (21), we cannot extrapolate our results to the general population. Therefore, due to the type of sampling and the limited number of consumers used in our study, we cannot fully infer about the acceptability of kefir for Portuguese consumers. Nevertheless, these results can provide an indication of how the product is viewed by consumers with no previous contact with this beverage. Hedonic opinions, such as food choice, are affected by environmental context and individual expectations (22,23). Both the intra- and the inter-variability of consumers may influence the product acceptance throughout time (7,22,23). In general, the individual like/dislike stimuli may be influenced by environment, for example, type of meal, time of day, number of times the food has been consumed recently or temperature of the food, thus increasing the difficulty of measuring a stable attitude toward a certain food (7,24). As stated by Lawless & Heymann (2010), habits, experiences, contexts and attitudes are important contributors to the actual consumption of a food in a specific situation (7). Since the participants in our study were all part of the same group and so, were not blind to kefir consumption, this

aceitação (testes de gosto do consumidor) devem ser realizados preferencialmente com um grande número de indivíduos (6). Alguns autores recomendam que 50 consumidores como o mínimo desejável para garantir a precisão da análise estatística, podendo, assim, concluir sobre a aceitação do produto (não aplicável a provadores treinados) (5,6,8). Além disso, porque utilizámos uma amostra de conveniência, com voluntários já dispostos a participar num estudo envolvendo o consumo de kefir por oito semanas, cuja principal desvantagem é a falta de generalização clara (21), não podemos extrapolar os nossos resultados para a população em geral. Portanto, devido ao tipo de amostragem e ao número limitado de consumidores usados no nosso estudo, não podemos inferir completamente sobre a aceitabilidade do kefir para o consumidor português. No entanto, estes resultados podem fornecer uma indicação de como o produto é visto por consumidores sem contato prévio com este bebida. As opiniões hedónicas, como a escolha alimentar, são afetadas pelo contexto ambiental e pelas expectativas individuais (22,23). A intra e a intervariabilidade dos consumidores podem, ambas, influenciar a aceitação do produto ao longo do tempo (7,22,23). Em geral, os estímulos individuais de gosto/não gosto podem ser influenciados pelo contexto ambiental, como por exemplo, pelo tipo de refeição, hora do dia, número de vezes que o alimento foi

### Kefir acceptability / Aceitabilidade do kefir



**Figure 2** - Kefir acceptability in a sample of Portuguese consumers based on the 9-point hedonic scale (frequency (%), n=19)

**Figura 2.**- Aceitabilidade do kefir numa amostra de consumidores portugueses baseada na escala hedónica de 9 pontos (frequência (%), n=19).

factor may have influenced the individual choices of the volunteers, despite the fact that the scale was presented to each participant individually. Nevertheless, these results support the adoption of the protocol applied to our in-use "DermapBio" study of the impact on the skin health of kefir consumption conducted by our research team, as during the study this beverage must be taken daily.

## Conclusion

General consumer acceptance of fermented foods, such as kefir, that are characterized by their unique flavor and aroma are mainly dependent of their sensory perception. Although kefir is not traditionally consumed in Portugal, our kefir drink showed a good acceptance in this sample of consumers and supports the protocol adopted in a posterior study.

## Author Contributions Statement

PR, CR, LMR, and EA conceptualization and study design; EA experimental implementation; EA and CR data analysis; EA illustrations; EA, PR and CR drafting editing and reviewing

## Funding

This work is financed by national funds through the FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., through projects UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 to CBIOS.

## Conflict of Interests

The senior editors co-authoring this manuscript had no participation in the review nor in the decision process.

All authors have declared there were no financial and/or personal relationships that may present a potential conflict of interest.

consumido recentemente ou temperatura do alimento, aumentando assim a dificuldade de medir uma atitude estável em relação a um determinado alimento (7,24). Como afirmam Lawless & Heymann (2010), hábitos, experiências, contextos e atitudes são importantes contribuintes para o consumo real de um alimento numa situação específica (7). Dado que os participantes no nosso estudo faziam parte do mesmo grupo e, portanto, não eram cegos ao consumo de kefir, esse fator pode ter influenciado nas escolhas individuais dos voluntários, apesar de a escala ter sido apresentada a cada participante individualmente. No entanto, estes resultados apoiam a adoção do protocolo aplicado a nossa estudo in-use "DermapBio" do impacto do consumo de kefir na saúde da pele, conduzido pela nossa equipa de investigação, á que este bebida deve ser tomado diariamente.

## Conclusões

A aceitação pelo consumidor em geral de alimentos fermentados, como o kefir, que são caracterizados pelo seu sabor e aroma únicos, depende principalmente da sua percepção sensorial. Embora o kefir não seja tradicionalmente consumido em Portugal, a nossa bebida kefir mostrou uma boa aceitação nesta amostra de consumidores e apoia o protocolo adotado num estudo posterior.

## Declaração sobre as contribuições do autor

PR, EA, LMR e CR, Conceptualização e desenho de estudos; EA implementação experimental; EA e CR Análise de dados; EA ilustrações;EA PR e CR, edição e revisão da redação

## Financiamento

Este trabalho é financiado com fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 do CBIOS.

## Conflito de Interesses

Os editores senior envolvidos na autoria deste manuscrito não tiveram qualquer participação no processo de revisão ou de decisão.

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

## References / Referências

1. Farnworth, E.R. (2005). Kefir—A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2, 1-17. doi:10.1616/1476-2137.13938.
2. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1-6. doi:10.1038/sj/jim/7000186.
3. Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibañez, F.C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613–620. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.021.
4. Drake, M.A. (2007). Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 90, 4925–4937. doi:10.3168/jds.2007-0332.
5. Lawless, H.T., Heymann, H. (1999). Consumer field tests and questionnaire design. In H.T. Lawless, H. Heymann (Eds.), *Sensory Evaluation of Food*, 1st Ed. (pp 480–514). New York, NY: Chapman and Hall.
6. Moskowitz, H. R., Beckley, J. H., & Resurreccion, A. V. A. (2012). *Sensory and Consumer Research in Food Product Design and Development* (H. R. Moskowitz, J. H. Beckley, & A. V. A. Resurreccion (eds.); 2nd ed.). Wiley-Blackwell.
7. Lawless, H.T., Heymann, H. (2010). Acceptance Testing. In H.T. Lawless, H. Heymann (Eds.), *Sensory Evaluation of Food* (pp. 325-344). doi:10.1007/978-1-4419-6488-5\_14.
8. Lim, J. (2011). Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Quality and Preferences*, 22, 733–747. doi:10.1016/j.foodqual.2011.05.008.
9. Illupapalayam, V. V., Smith, S. C., & Gamalath, S. (2014). Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.025>
10. Cruz, A. G., Walter, E. H. M., Cadena, R. S., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Pinheiro, H. P., & Sant’Ana, A. S. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, 43(5), 1444–1448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.028>.
11. Schutz, H.G., Cardello, A.V. (2001). A labeled affective magnitude (LAM) scale for assessing food liking/disliking. *Journal of Sensorial Studies*, 16, 117–159.
12. Stone, H., Bleibaum, R.N., Thomas, H.A. (2012). Measurement. In H. Stone, R.N. Bleibaum & H. Thomas (Eds.). *Sensory Evaluation Practices* (pp. 81–115). doi:10.1016/b978-0-12-382086-0.00003-0.
13. Everitt, M. (2009). Consumer-targeted sensory quality. In G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, & P. Colonna (Eds.). *Global issues in food science and technology* (pp. 117–128). doi: 10.1016/B978-0-12-374124-0.00008-9.
14. Moretti, A.F., Gamba, R.R., Costa, M., De Antoni, G., Peláez, Á.L. (2019). Protective Effect of Lyophilization on Fermentative, Microbiological and Sensory Properties of Kefir. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology*, 1(1), 5-11. doi: 10.18689/ijbp-1000102.
15. Van Trijp, H.C.M., Schifferstein, H.N.J. (1995). Sensory analysis in marketing practice: comparison and integration. *Journal of Sensorial Studies*, 10, 127–147. doi.org/10.1111/j.1745-459X.1995.tb00010.x.
16. Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>.
17. Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., Huys, G., Vandamme, P., & Abraham, A. G. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiology*, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.022>.
18. Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>.
19. Lim, J., Fujimaru, T. (2010). Evaluation of the labeled hedonic scale under different experimental conditions. *Food Quality and Preference*, 21, 521-530. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.02.001>.
20. Curia, A.V., Hough, G., Martinez, M.C., Margalef, M.I. (2001). How Argentine consumers understand the Spanish translation of the 9-point hedonic scale. *Food Quality and Preference* 12, 217–221. doi: 10.1016/s0950-3293(01)00012-x.
21. Bornstein, M. H., Jager, J., & Putnick, D. L. (2013). Sampling in developmental science: Situations, shortcomings, solutions, and standards. *Developmental Review*, 33(4), 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.dr.2013.08.003>.
22. Deliza, R., MacFie, H.J.H. (1996). The generation of sensory expectation by external cues and its effect on sensory perception and hedonic ratings: A review. *Journal of Sensorial Studies*, 11, 103–128. doi.org/10.1111/j.1745-459X.1996.tb00036.x.
23. Schifferstein, H.J.N. (1995). Contextual shifts in hedonic judgment. *Journal of Sensorial Studies*, 10, 381–392. doi.org/10.1111/j.1745-459X.1995.tb00027.x.
24. Kahkonen, P., Tuorila, H., Hyvonen, L. (1995). Dairy fact content and serving temperature as determinants of sensory and hedonic characteristics of cheese soup. *Food Quality and Preference*, 6, 127–133. doi.org/10.1016/0950-3293(95)98555-W.

## Preliminary sensory evaluation of grape pomace flour sweet cookies

*Avaliação sensorial preliminar de bolachas doces de farinha de bagaço de uva*

M. Lídia Palma <sup>1\*</sup>, Cíntia Ferreira-Pêgo <sup>1</sup>, Marisa Nicolai <sup>1</sup>, Paula Pereira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

<sup>2</sup>CERENA - Instituto Superior Técnico (IST) Center for Natural Resources and Environment, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

\*corresponding author: p1814@ulusofona.pt

---

### Abstract

The sustainable use of resources and industrial waste is an important objective for environmental preservation and in the search for potential new foods and ingredients. Considering the size and importance of the wine industry, the use of winemaking waste in a sustainable manner is important for producers. Given the nutritional characteristics of this by-product, its use as an ingredient may be an interesting source of income, especially in Portugal, where around 183 thousand tons of this waste are generated annually. In addition to studies regarding the nutritional characteristics and active constituents, it is necessary to evaluate the acceptability of potential buyers to different food matrices resulting from the incorporation of grape pomace flour. This study was designed to evaluate the acceptability of sweet cookies with the incorporation of different percentages of grape pomace flour resulting from the vinification of Arinto and Touriga Nacional grape varieties. The sensory assessment of 149 individuals was evaluated using a questionnaire developed for this purpose. The results obtained are not conclusive, but there is a tendency for the preference for cookies with the incorporation of grape pomace flour at 15% versus incorporation of 20%, independent of the caste used.

**Keywords:** Grape pomace; sweet cookies; sensory evaluation; Touriga Nacional; Arinto

---

### Resumo

A utilização sustentável de recursos e resíduos industriais, constituem um importante objetivo para a preservação ambiental e para a procura potencial de novos alimentos e ingredientes. Considerando a dimensão e importância da indústria vitivinícola, o aproveitamento dos resíduos da vinificação de uma forma sustentável constitui um objetivo para produtores. Atendendo às características nutricionais deste subproduto a sua utilização como ingrediente pode constituir uma importante fonte de rendimento, em especial em Portugal onde são gerados anualmente cerca de 183 mil toneladas deste resíduo. Para além dos estudos de caracterização nutricional torna-se necessário avaliar a aceitabilidade de potenciais compradores face a diferentes matrizes alimentares resultantes da incorporação de farinha de bagaço. Este estudo avaliou a aceitabilidade de bolachas doces com incorporação de diferentes percentagens de farinha de bagaço de uva, resultante da vinificação das castas de Arinto e Touriga Nacional. Foram avaliadas as respostas de 149 indivíduos face a um questionário de avaliação sensorial desenvolvido para o efeito. Os resultados obtidos não são conclusivos, mas existe uma tendência para a preferência de bolachas com incorporação de 15% de farinha de bagaço de uva face à incorporação de 20% independentemente da casta usada. .

**Palavras-chave:** Bagaço de uva; bolachas doces; avaliação sensorial; Touriga Nacional; Arinto

## Introduction

The sustainable use of resources and the use of waste are currently important aspects of the political and social agenda of countries at a global level. In this sense, the 2030 agenda of the UN has defined 17 sustainable objectives, which aim to be a common vision of development for humanity, including sustainable production and development (1). The use of waste from the wine industry has been the target of several studies in recent years (2), since its use as fertilizer (3), as a source of antioxidants and polyphenols (4–6) or use in cosmetics (7) and the pharmaceutical industry (8), or as an additive in food (9). The most sustainable way of using pomace seems to be in the form of pomace flour for food purposes. In this way it can constitute not only an important product with food value (10,11) but also an important source of income for the main producing countries. Portugal is included among these countries, with a total planted area of 6.3% of the total national agricultural area (12) with annual wine production in 2019/2020 of about 6.5 million hl (IVV) which generated about 183,000 tons of grape pomace (13). According to Regulation (EC) 1493/1999, pomace is the residue obtained after the pressing of fresh grapes, fermented or not, during the wine production process. Stalks, skins, and pips are integral parts of this residue. We have been studying (14) pomace flour, which results from the drying and milling of pomace. Studies regarding the importance and nutritional characterization of this product have indicated a constitution rich in polyphenols and antioxidants (14), low protein content, and high soluble and insoluble fiber content (15–18).

To introduce this flour as an ingredient in the food industry, it is necessary to complement the characterization studies of this product with consumer sensory evaluation studies using different matrices and different percentages of incorporation. In this sense, after the study of the sensory analysis of the incorporation of flour in a savory cracker (19), where a preference for cookies with higher percentages of incorporation was shown, the main objective of the present study was to preliminarily evaluate the acceptability of a sweet cookie with higher percentages of incorporation of pomace flour from one of two Portuguese grape varieties among a panel of untrained consumers.

## Introdução

A utilização sustentável dos recursos e o aproveitamento de resíduos são, atualmente, importantes aspetos da agenda política e social dos países a nível global. Neste sentido a agenda 2030 da ONU definiu 17 objetivos sustentáveis, que pretendem ser uma visão comum de desenvolvimento para a Humanidade, entre os quais se inclui a produção e desenvolvimento sustentável (1). O aproveitamento de resíduos da indústria do vinho tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos (2), desde a sua utilização como fertilizante (3), como fonte de antioxidantes e polifenóis (4–6) para a utilização tanto na cosmética (7) como na indústria farmacêutica (8) ou como ingrediente na alimentação (9). A forma mais sustentável de utilização do bagaço parece ser na forma de farinha de bagaço para fins alimentares, já que desta forma pode constituir não só um importante produto com valor alimentar (10,11), como uma importante fonte de rendimento para os principais países produtores, nos quais se insere Portugal em que o total de área plantada é de 6,3% do total de área agrícola nacional (12) com uma produção anual de vinho em 2019/2020 de cerca de 6,5 milhões de hl (IVV) os quais geraram cerca de 183 mil toneladas de bagaço de uva (13). O resíduo, na forma de farinha de bagaço, que temos vindo a estudar (14), resulta da secagem e moagem do subproduto da vinificação caracterizado como bagaço (13), que de acordo com o regulamento (CE) 1493/1999, estabelece este produto como o resíduo obtido após a prensagem das uvas frescas, fermentado ou não, durante o processo de produção de vinho, do qual fazem parte integrante os engaços, os pedúnculos, as películas e as grainhas. A importância e caracterização nutricional deste produto tem vindo a ser estudada, a qual indica uma constituição rica em polifenóis e antioxidantes (14), baixo teor em proteína e elevado conteúdo em fibra tanto solúvel como insolúvel (15–18).

Com o objetivo de introduzir esta farinha como um ingrediente na indústria alimentar torna-se necessário complementar os estudos de caracterização deste produto com estudos de avaliação sensorial dos consumidores em diferentes matrizes e com diferentes percentagens de incorporação. Neste sentido após o estudo da análise sensorial da incorporação da farinha numa bolacha salgada (19) o principal objetivo do presente estudo foi avaliar, preliminarmente, a aceitabilidade, de consumidores não treinados, para uma bolacha doce com percentagens mais elevada de incorporação de farinha de bagaço de uva, resultante de duas castas portuguesas, já que estudos anteriores demonstraram uma preferência por bolachas com percentagens mais elevadas de incorporação (19).



## Materials and Methods

### Biological samples

The Carmin Cooperative winery in Reguengos de Monsaraz provided two types of grape pomace samples, one of white grape variety (Arinto) and another of red grape variety (Touriga Nacional). After receiving the samples, they were dried in an oven (J.P. Selecta, Barcelona, Spain), for 24 hours at 60 °C, ground in a household slide crusher (Moulinex, Alencon, France), and finally stored in propylene bags properly sealed until their use.

### Cookie preparation

Five sweet cookie recipes were prepared based on a recipe with wheat flour, which was replaced in percentages of 15% and 20% by grape pomace flour of the grape varieties (Touriga Nacional and Arinto). The ingredients used in the preparation of the sweet cookies were T55 extra-fine wheat flour (National), refined white sugar (Sidul), butter with salt (Agros), semi-skimmed milk (Agros), and grape pomace flour. The quantities of ingredients used are described in Table 1.

In the preparation of the dough, the sugar and butter were first added until a homogeneous and whitish mixture was obtained. Then the wheat flour and/or grape pomace flour and gradually the milk were mixed in to obtain a consistent dough. Finally, the dough was kneaded and allowed to rest for 10 minutes, then rolled thin and cut into small rectangles (3x2.5cm). The cookies were placed in an industrial oven (Eka KF912 - Tecnoeka Sri, Padova, Italy) for 10 minutes at 180 °C, then remaining in the oven until it was completely cooled. The various stages of preparation of the cookies are shown in Figure 1.

## Material e Métodos

### Amostras biológicas

A adega Cooperativa Carmin em Reguengos de Monsaraz forneceu dois tipos de amostras de bagaço de uva, uma de casta branca (Arinto) e outra de casta tinta (Touriga Nacional). Após a receção das amostras, estas foram secas na estufa (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha), durante 24 horas a 60°C, moídas num triturador de lâminas doméstico (Moulinex, Alencon, França) e por fim armazenadas em sacos de propileno devidamente selados até sua utilização.

### Preparação das bolachas

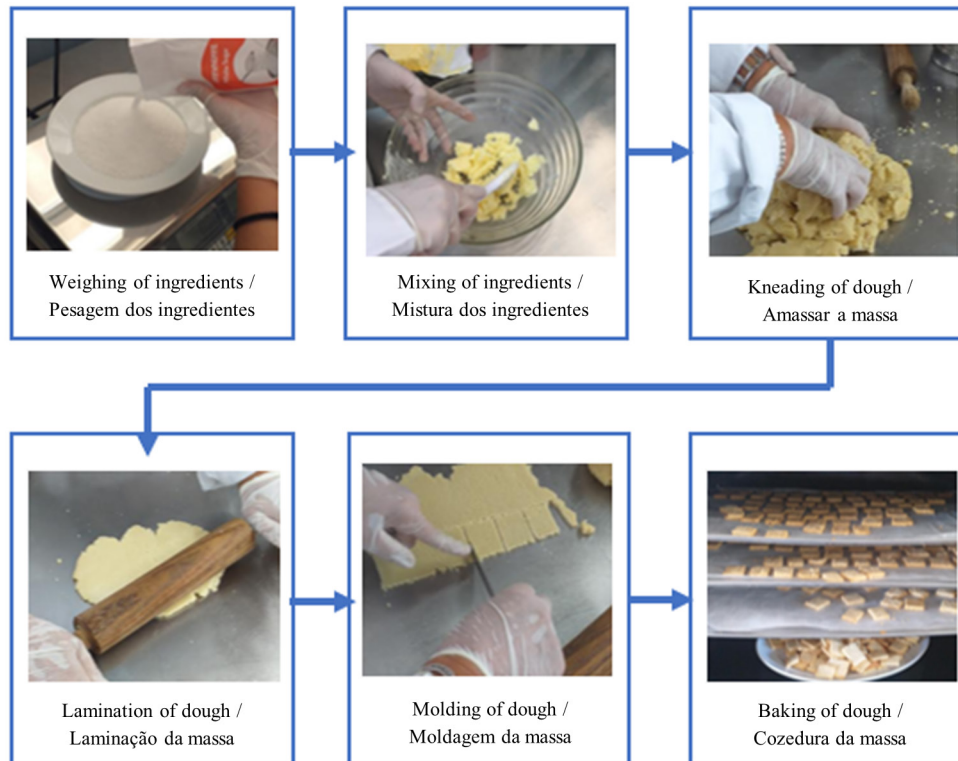
Procedeu-se à preparação de cinco receitas de bolachas doce, tendo como base uma receita com farinha de trigo, a qual foi substituída nas percentagens de 15% e 20% por farinha de bagaço de uva das castas (Touriga Nacional e Arinto). Os ingredientes utilizados na confeção das bolachas doces foram farinha de trigo T55 extrafina (National), açúcar branco refinado (Sidul), manteiga com sal (Agros), leite meio gordo (Agros) e farinha de bagaço de uva. As quantidades de ingredientes usados estão descritas na Tabela 1.

Na confeção da massa juntou-se primeiro o açúcar com a manteiga até se obter uma mistura homogénea e esbranquiçada. De seguida, misturou-se a farinha de trigo e/ou farinha de bagaço de uva e, aos poucos, o leite de modo a obter-se uma massa consistente. Por fim, amassou-se e repousou por 10 minutos, de seguida estendeu-se e recortou-se em pequenos retângulos (3x2,5 cm). As bolachas foram colocadas no forno industrial (Eka KF912 – Tecnoeka Sri, Padova, Italia) durante 10 minutos a 180 °C até arrefecimento total do forno. Na Figura 1 podem observar-se as várias etapas de preparação das bolachas.

**Table 1** - Ingredients in the formulation of the sweet cookies

**Tabela 1** - Ingredientes da formulação das bolachas doces

Ingredients / Ingredientes	Control / Controlo	15% Incorporation / Incorporação	20% Incorporation / Incorporação
Wheat flour / Farinha de trigo, g	250 ± 0.01	212.5 ± 0.01	200 ± 0.01
White sugar / Açúcar branco, g	125 ± 0.01	125 ± 0.01	125 ± 0.01
Butter / Manteiga, g	60 ± 0.01	60 ± 0.01	60 ± 0.01
Milk / Leite, mL	50 ± 0.01	50 ± 0.01	50 ± 0.01
Grape pomace flour / Farinha de bagaço de uva, g	-	37.5 ± 0.01	50 ± 0.01



**Figure 1** - Preparation of sweet crackers with incorporation of grape pomace flour  
**Figura 1** - Preparação de bolachas doces com incorporação de farinha de bagaço de uva

### *Sensory evaluation*

This study aimed at the preliminary analysis of sensory evaluation in a group of 149 untrained individuals of both sexes, aged between 18 and 88 years. Although the use of trained tasters panels is more commonly used in this type of evaluation, the use of untrained panels can be justified for the options of free choice, or non-validated questionnaires (20), as is the present case.

For the sensory test, taking into account the current pandemic context and the recommendations and norms of the General Directorate of Health (DGS), a questionnaire was created through the Google Forms platform, which the tasters accessed through a QR code on their smartphone or tablet and thus recorded their opinion at the time of the test. Participants were randomly recruited at the university campus on the tasting tests day.

Two tests were carried out on different days. The sensory test with integration of the Arinto caste grape pomace included 74 participants of both sexes aged between 16 and 88 (PD:17.27) years, and the test for the Touriga Nacional caste grape pomace included 66 participants of both sexes aged between 18 and 88 (PD: 15.88) years. The frequency scale used was developed

### *Avaliação sensorial*

O presente estudo teve como objetivo a análise preliminar de avaliação sensorial num grupo de 149 indivíduos não treinados, de ambos os sexos, de idades compreendidas entre os 18 e os 88 anos. Embora a utilização de painéis de provadores treinados seja mais utilizada neste tipo de avaliação o uso de painéis não treinados pode ser justificada para as opções de livre escolha ou questionários não validados (20), como é o caso do presente estudo.

Para a realização da prova sensorial, tendo em conta o atual contexto de pandemia e as recomendação e normas da Direção Geral da Saúde (DGS) foi criado um questionário, através da plataforma Google Forms, ao qual os provadores acediam através de um código QR no seu smartphone ou tablet e assim registavam a sua opinião no momento da prova. Os participantes foram aleatoriamente recrutados no campus universitário no dia da avaliação sensorial.

Foram realizadas duas provas, em dias distintos, tendo participado na prova sensorial com integração nas bolachas da casta Arinto 74 indivíduos de ambos os sexos de idades compreendidas entre os 16 e 88 (DP:17.27) anos, e na casta Touriga Nacional 66

**Table 2 - Hedonic and willingness to purchase scales**  
**Tabela 2 - Escala hedónica e Intenção de compra**

	<b>Hedonic / Hedónica</b>	<b>Purchase / Compra</b>
5	Very pleasant / Muito agradável	Certainly buy / Compraria de certeza
4	Pleasant / Agradável	Would probably buy / Provavelmente compraria
3	Indifferent / Indiferente	Do not know if I would buy / Não sei se compraria
2	Unpleasant / Desagradável	Probably would not buy / Provavelmente não compraria
1	Very unpleasant/ Muito desagradável	Certainly would not buy / Não compraria de certeza

by Palma and collaborators (19) in which the tasters gave their opinion regarding color, taste, texture, aroma, and overall final impression. The intention to purchase was also parameterized according to a 5 point scale according to that previously used by the same authors (19) and is described in Table 2. A comparative assessment of the samples was also made using a 3 point scale described in Table 4 and previously used by the authors (19).

#### *Statistical analysis*

Data were presented either as means and standard deviation (SD) for continuous variables or numbers and percentages for dichotomous variables. We compared the distribution of the selected characteristics between groups using Pearson  $\chi^2$  tests for categorical variables or Student's t-tests or analysis of variance (ANOVA), as appropriate, for continuous variables. All statistical tests were two-tailed and the significance level was set at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using the SPSS software version 26.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

### **Results and Discussion**

A total of 149 individuals (57 men and 92 women) with an average age of 40.45 (SD=16.45) participated in this work. The mean age according to sex and castes are summarized in Table 3. Individuals who tasted sweet cookies with the incorporation of Arinto bagasse flour had a mean age of 39.21 years, and those who tasted cookies with the incorporation of Touriga Nacional bagasse flour had a mean age of 41.96 years. No statistically significant differences were observed between the age and gender of the tasters who evaluated the two varieties. Figure 2 shows the results obtained from the sensory evaluation according to the different varieties and incorporations studied, in which it is possible to observe statistically significant differences regarding color, flavor, taste, and texture. Regarding

indivíduos de ambos os sexos de idades compreendidas entre os 18 e os 88 (DP: 15.88) anos.

A escala de frequência usada foi desenvolvida por Palma e colaboradores (19) na qual os provadores deram opinião relativamente à cor, sabor, textura, aroma e impressão global final. A intenção de compra foi igualmente parametrizada segundo uma escala com 5 pontos de acordo com a anteriormente utilizada pelos mesmos autores (19) e descrita na Tabela 2, foi ainda feita uma apreciação comparativa das amostras avaliada por uma escala de 3 pontos descrita na Tabela 4 e já anteriormente usada pelos autores (19).

#### *Análise estatística*

Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou números e percentagens para variáveis dicotómicas. Comparámos a distribuição das características selecionadas entre os grupos usando testes de Pearson  $\chi^2$  para variáveis categóricas ou testes t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado, para variáveis contínuas. Todos os testes estatísticos foram bicaudais e o nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS versão 26.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA).

### **Resultados e Discussão**

Um total de 149 indivíduos (57 homens e 92 mulheres) com uma idade média de 40,45 (DP=16.45) anos participaram no presente trabalho. A idade média de acordo com o sexo e com as castas estão resumidas na Tabela 3. Os indivíduos que provaram bolachas doces com incorporação de farinha de bagaço de Arinto apresentaram uma idade média de 39,21 anos e os que provaram bolachas com incorporação de farinha de bagaço Touriga Nacional apresentaram uma idade média de 41,96 anos. Não foram observadas diferenças

color, the highest score obtained was for the control cookie, and the lowest scores were obtained for the two incorporations of Touriga Nacional. Similar results were obtained in the case of flavor since the control cookie obtained the highest score and the Touriga Nacional with 15% of incorporation had the lowest score. The two varieties with 20% incorporation were described as the least favorite flavor, with a score of 3.83 points over a maximum of 5. The cookie with 15% incorporation of grape pomace from the Touriga Nacional variety was the most accepted texture compared to the rest of the samples analyzed. Finally, the highest score concerning the overall appreciation was for the control of sweet cookies, and secondly for the incorporation of 15% of

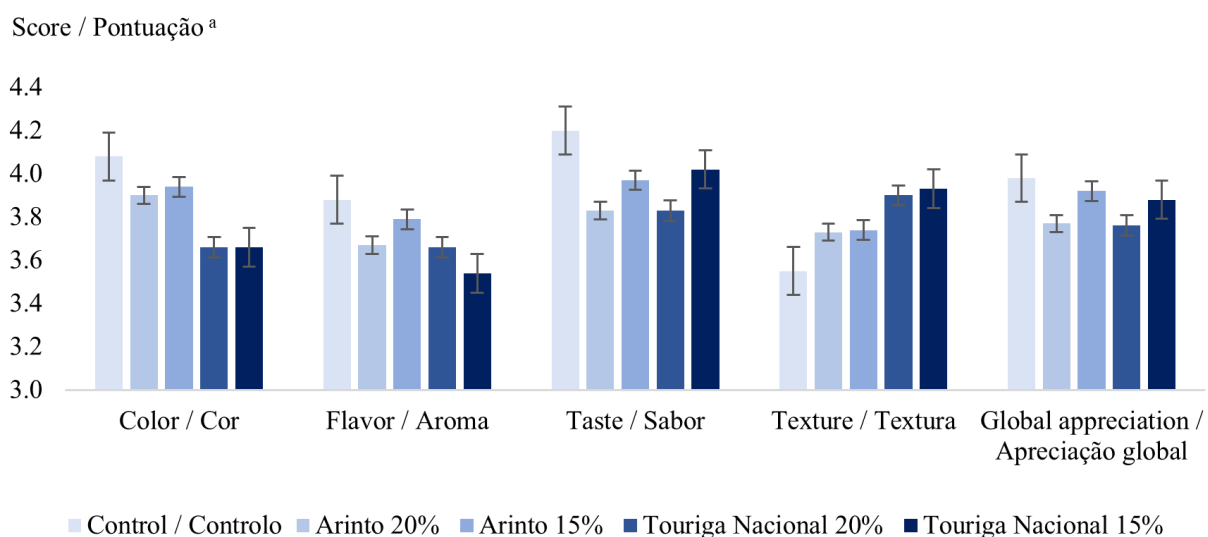
estatisticamente significativas entre a idade e sexo dos provadores que avaliaram as duas castas. A Figura 2 mostra os resultados obtidos da avaliação sensorial de acordo com as diferentes castas e incorporações estudadas, na qual é possível observar diferenças estatisticamente significativas quanto à cor, sabor, gosto e textura. Relativamente à cor, a pontuação mais alta obtida foi para a bolacha controlo, e as pontuações mais baixas foram obtidas para as duas incorporações da casta Touriga Nacional. Resultados semelhantes foram obtidos no caso do sabor, uma vez que a bolacha controlo foi a que obteve uma pontuação mais alta e a Touriga Nacional com 15% de incorporação a que teve uma pontuação mais baixa. As duas castas com 20%

**Table 3** - Mean age according to gender and grape varieties

**Tabela 3** - Média de idade de acordo com o género e castas utilizadas

	Age, years / Idade, anos	p-value*
<b>Total population / População total (n=149)</b>	40.45 (16.45)	-
<b>Gender / Género</b>		
Men / Homem (n=57)	37.34 (14.92)	0.060
Women / Mulher (n=92)	42.38 (17.13)	
<b>Grape variety / Castas</b>		
Arinto (n=83)	39.21 (17.19)	0.696
Touriga Nacional (n=66)	41.96 (15.50)	

Age is expressed as means (SD). \*p-values for comparisons between groups were tested by Student's t-test / Idade expressa em média (DP). \*Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student.



**Figure 2** - Sensory evaluation according the different incorporation and grape varieties. Data expressed as means (SD). \*p-value <0.005. <sup>a</sup> Score: Color, Aroma, Flavor, Texture, Global impression=1-Very unpleasant, 2-Unpleasant, 3-Indifferent, 4-Pleasant, 5-Very pleasant

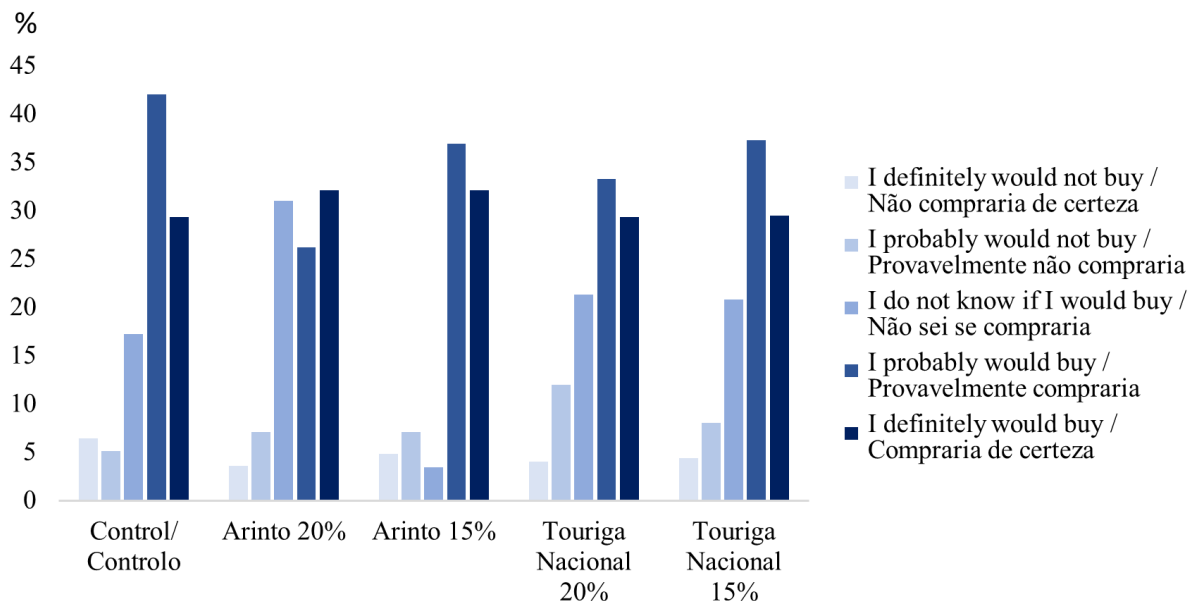
**Figura 2.-** Análise sensorial de acordo as diferentes incorporações e castas. Dados expressos como média (DP). \*Valores P <0.005. <sup>a</sup> Pontuação: Cor, Aroma, Sabor, Textura, Impressão global=1- Muito desagradável, 2-Desagradável, 3-Indiferente, 4-Agradável, 5-Muito agradável.

Arinto grape pomace. The lowest score was obtained for the incorporation of 20% Touriga Nacional. These differences were not statistically significant, however, the preference for cookies with the incorporation of Arinto flour is a factor previously observed in the sensory evaluation study of Palma *et al* (19).

The intention of purchasing sweet cookies with 15 and 20% of grape pomace incorporation of Arinto and Touriga Nacional grape varieties can be observed in Figure 3. The highest percentage of individuals who reported that they would certainly buy was relative to the sweet cookies with 15 and 20% of Arinto grape pomace incorporation (32.1% for each). The sweet cookies with the lowest purchase intention were the control sweet cookies since 6.4% of the total population reported that they had no intent to buy them

de incorporação foram descritas como o sabor menos apreciado, tendo uma pontuação de 3,83 pontos sobre um máximo de 5. A bolacha com 15% de incorporação de bagaço de uva da casta Touriga Nacional foi a textura mais aceite em comparação com o resto das amostras analisadas. Finalmente, a pontuação mais alta em relação à apreciação global foi para as bolachas doces controlo, e em segundo lugar para a incorporação de 15% de bagaço de uva de Arinto. A pontuação mais baixa foi obtida pela incorporação de 20% de Touriga Nacional. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas, no entanto a preferência para bolachas com incorporação de farinha de Arinto é um fator já observado anteriormente, no estudo de avaliação sensorial de Palma *et al* (19).

A intenção de compra de bolachas doces com 15 e 20% de incorporação de bagaço de uva das castas Arinto e Touriga Nacional pode ser observada na Figura 3. A maior percentagem de indivíduos que relataram que comprariam de certeza foi relativo às bolachas doces com incorporação de 15 e 20% de bagaço de uva Arinto (32,1% para cada uma). As bolachas doces com a menor intenção de compra foram as bolachas doces controlo, uma vez que 6,4% da população total referiu que não os comprariam de certeza.



**Figure 3** - Purchase intention for sweet cookies with incorporation (15 and 20%) of the Arinto variety (n = 84) and sweet cookies with incorporation (15% and 20%) of the Touriga Nacional variety (n = 65). Data expressed as percentage (%).

**Figura 3** - Intenção de compra para bolachas doces com incorporação (15 e 20%) da casta Arinto (n = 84) e para bolachas doces com incorporação (15% e 20%) da casta Touriga Nacional (n = 65). Dados expressos como percentagem (%).

**Table 4** - Preference of sweet cookies selection  
**Tabela 4** - Preferência de escolha das bolachas doces

	Liked best / Gostei mais	More or less liked / Gostei mais ou menos	Liked least / Gostei menos	p-value*
<b>Type of flour / Tipo de farinha</b>				
Control/ Controlo (n=149)	40.9 (61)	18.1 (27)	40.9 (61)	
Arinto (n=148)	27.1 (45)	38.6 (46)	34.3 (57)	<0.001
Touriga Nacional (n=132)	32.6 (43)	43.9 (58)	23.5 (31)	
<b>p-value*</b>	0.033	<0.001	0.008	
<b>Grape pomace samples / Amostras de farinha de bagaço</b>				
Arinto 15% (n=74)	26.5 (22)	32.5 (18)	41.0 (34)	
Arinto 20% (n=74)	27.7 (23)	44.6 (28)	27.7 (23)	<0.001
Touriga Nacional 15% (n=66)	34.8 (23)	37.9 (25)	27.3 (18)	
Touriga Nacional 20% (n=66)	30.3 (20)	50.0 (33)	19.7 (13)	
<b>p-value*</b>	0.129	<0.001	0.008	
<b>% Incorporation / % Incorporação</b>				
15% Incorporation / Incorporação (n=149)	30.2 (45)	34.9 (52)	34.9 (52)	<0.001
20% Incorporation / Incorporação (n=149)	28.9 (43)	47.0 (70)	24.2 (36)	
<b>p-value*</b>	0.053	<0.001	0.008	

Data expressed as a percentage (n). \*p-values for comparisons between groups were tested by Pearson  $\chi^2$  / Dados expressos como percentagem (n). \*Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante Pearson  $\chi^2$

Finally, Table 4 shows the preferences of choice among all the samples analyzed. Regarding the analysis according to the type of flour, statistically, significant differences were observed between these cookies and the classification of “liked more,” “liked more or less,” and “liked less.” The most appreciated cookie was the control, followed by Touriga Nacional and finally, Arinto. These results are not in line with the opinion that the respondents expressed regarding individual parameters or overall appreciation. This apparent discrepancy is sometimes observed, as consumers can provide emotional type responses of “like” or “dislike” which do not always reflect the same pattern they express in the evaluation of various attributes on a hedonic scale of several points (20). Nevertheless, in this analysis of preference regarding the various incorporations and varieties, the most appreciated was Touriga Nacional with 15% grape pomace incorporation. However, these differences were not statistically significant. The highest percentage of individuals who appreciated less

Finalmente, a Tabela 4 mostra as preferências de escolha entre todas as amostras analisadas. Relativamente à análise de acordo com o tipo de farinha, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre estes biscoitos e a classificação de “gostei mais”, “gostei mais ou menos”, e “gostei menos”. A bolacha mais apreciada foi a de controlo, seguida pela Touriga Nacional e por último a Arinto, resultados que não estão em linha com a opinião que os inquiridos expressaram relativamente aos parâmetros individuais ou apreciação global, este facto é algumas vezes observado, na medida em que os consumidores face a respostas do tipo emocional “gosto” ou “não gosto”, nem sempre refletem o mesmo comportamento que expressam frente à avaliação de vários atributos numa escala hedônica de vários pontos (20). Ainda nesta análise de preferência relativa às várias incorporações e castas, a mais apreciada foi a Touriga Nacional com 15% de incorporação de bagaço de uva. Contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

was relative to the sweet cookie with 15% incorporation of Arinto grape pomace. Finally, when the data were analyzed according to the incorporation percentage, the most appreciated sweet cookie was the one with 15% grape pomace incorporation, however, the differences were not statistically significant between the varieties. The highest percentage of individuals who did not appreciate the cookies analyzed also referred to the incorporation of 15% of grape pomace, thus, these results were inconclusive. It should be noted that the choice of 15% and 20% of grape pomace flour incorporation is related to the results obtained in a previous study conducted by Palma *et al.*, in which the participants showed a clear preference for samples that contained the highest percentage of incorporation (15%). Also, previous studies with other matrices used percentages of incorporation of 20% (21-23), which is why we consider it important to evaluate the acceptability of the participants for higher incorporation than we had previously studied.

The main limitation of the study was the pandemic context and the recommendations and norms of the General Directorate of Health (DGS), which made it impossible to gather a group of trained tasters and used the methodology indicated for these types of tests. Other limitations were the form in which we accessed each participant's opinion, as the questionnaire created through the Google Forms platform appeared not suitable for an overaged population. Another limitation was the exclusion and inclusion criteria; in the current context, the only criteria used were the availability and willingness to participate. The main strength was the possibility of assessing, for the first time, the acceptability of cookies with a 20% incorporation of grape flour. The maximum we had previously tested was 15% incorporation.

## Conclusion

The results obtained although they show a preference for the control cookie, the differences are not statistically significant. It is not possible to conclude from these results which is the most appreciated incorporation by consumers. In the assessment with several attributes and the overall assessment, the respondents refer a preference for the cookie with 15% incorporation of flour from Arinto, without statistically significant differences. However, faced with the option of choosing between "liked a lot," "liked more or less" and "did not like," the cookie with the highest score, with statistically significant differences, is the cookie

A percentagem mais elevada de indivíduos que menos apreciaram, foi relativa à bolacha doce com incorporação de 15% de bagaço de uva de Arinto. Finalmente, quando se analisaram os dados em função da percentagem de incorporação, a bolacha doce mais bem aceite foi a que continha 15% de incorporação de bagaço de uva, no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas entre as castas. A maior percentagem de indivíduos que não apreciaram as bolachas analisadas, referiu-se também à incorporação de 15% de bagaço de uva, sendo estes resultados pouco conclusivos. De salientar que a escolha de 15% e 20% de incorporação de farinha de bagaço de uva, está relacionada com os resultados obtidos num estudo anterior realizados por Palma *et al*, na qual os participantes mostraram uma clara preferência para as amostras que continham a maior percentagem de incorporação (15%), para além disso estudos anteriores (21-23) com outras matrizes usaram percentagens de incorporação de 20%, razão pela qual consideramos importante avaliar a aceitabilidades dos participantes para uma incorporação superior à que anteriormente tínhamos estudado.

A principal limitação do estudo foi o contexto pandémico e as recomendações e normas da Direção Geral da Saúde (DGS), por causa delas foi impossível reunir um grupo de provadores formados e utilizar a metodologia indicada para estes tipos de testes. Outras limitações foram a forma em que acedemos ao parecer do participante, o questionário criado através da plataforma Google Forms parece não ser adequado a uma população com excesso de idade. Outra limitação é o critério de exclusão e inclusão, no contexto atual, o único critério utilizado foi a disponibilidade e a vontade de participar. O principal ponto forte foi a possibilidade de avaliar a aceitabilidade dos cookies com uma incorporação de 20% de farinha de uva, um valor nunca antes avaliado, uma vez que o máximo que tínhamos testado até agora tinha sido uma incorporação de 15%.

## Conclusões

Os resultados obtidos embora mostrem uma preferência para a bolacha controlo não existem diferenças estatisticamente significativas entre eles. Face aos resultados não é possível concluir qual a incorporação mais apreciada pelos consumidores, já que, na apreciação com vários atributos e na apreciação global os inquiridos referem uma preferência, sem diferenças significativas, para a bolacha com 15% de incorporação de farinha de Arinto, mas face à opção de escolha entre "gostei

with 15% incorporation of flour from Touriga Nacional. The results showed a preference of consumers for the incorporation of 15% for both Arinto and Touriga Nacional flours, however, given the preliminary character of this study, we consider that other studies should be conducted with trained tasters in which increased incorporation of grape pomace flour is evaluated in both sweet and salty matrices.

### **Authors Contributions Statement**

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

### **Funding**

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

C.F.P. is funded by Foundation for Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/NUT/2018.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge all the participants.

### **Conflict of Interests**

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

muito”, Gostei mais ou menos” e “não gostei” a bolacha que tem maior score, com diferenças estatisticamente significativas, é a bolacha com 15% de incorporação de farinha de Touriga Nacional. Os resultados mostraram uma preferência dos consumidores pela incorporação de 15% tanto para a farinha de Arinto como para a de Touriga Nacional, contudo dado o caráter preliminar deste estudo consideramos que devem ser realizados outros estudos com provadores treinados em que o aumento da incorporação seja avaliado, tanto em matrizes doces como salgadas.

### **Declaração sobre as contribuições do autor**

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

### **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.

Cíntia Ferreira Pêgo é financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) mediante o Contrato de Estímulo ao Emprego Científico com o número de referência CEEC/CBIOS/NUT/2018.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a todos os participantes.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram que não existe uma relação financeira ou pessoal que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.



## References / Referências

- 1 Organização das Nações Unidas (2015). Objetivos de desenvolvimento sustentável e o BCSO Portugal. Retrieved from <https://unric.org/pt/objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel/>
- 2 Gómez-Brandón, M., Lores, M., Insam, H., & Domínguez, J. (2019). Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 437–50. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2018.1555514>
- 3 Costa, M., Torres, A., Fernandes, A., Freitas, J., Teodósio, J., Pintado, M., & Leandro, E. (2007). a avaliação da qualidade do composto de bagaço de uva como fertilizante orgânico. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 85–92.
- 4 Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 8987–9003.
- 5 Oliveira, V.P.F. (2016). *Valorização de subprodutos da vinha e do vinho - composição fenólica e atividade antioxidante* [tese de Mestrado, Universidade Lusófona] de Humanidades e Tecnologias. <http://hdl.handle.net/10437/7213>
- 6 Zacharof, M.P. (2017). Grape winery waste as feedstock for bioconversions: Applying the biorefinery concept. *Waste Biomass Valor*, 8, 1011–25. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9674-2>
- 7 Soto, M.L., Falqué, E., & Domínguez, H. (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*, 2, 259–76. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259>
- 8 Leal, C., Gouvíñas, I., Santos, R.A., Rosa, E., Silva, A.M., Saavedra, M.J., & Barros, A.I.R.N.A. (2020). Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: valorization of a by-product. *Industrial Crops and Products*, 154:112675. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112675>
- 9 García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>
- 10 Strapasson, G. C. (2016). Caracterização e utilização do residuo de produção de vinho no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional. [tese de doutoramento, Universidade Federal do Paraná] Universidade Federal do Paraná. <https://hdl.handle.net/1884/42386>
- 11 Yu, J. & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 221–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- 12 Instituto Nacional de Estatística. (2021). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas : janeiro de 2021. Retrieved March 5, 2021, from <https://www.ine.pt/xurl/pub/71883762>
- 13 Hogervorst J. C., Miljić U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In Charis M. Galanakis (Eds.), *Grape Processing By-Products* (pp105-135). Handbook of Academic Press. ISBN 9780128098707 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00005-3>
- 14 Nicolai, M., Pereira, P., Rijo, P., Amaral, O., Amaral, A., & Palma, L. (2018). *Vitis vinifera* L. pomace: Chemical and nutritional characterization. *Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal*, 15(2), 156–66. <http://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-15-2-2018/art2.pdf>
- 15 Antonioli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, 178, 172–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>
- 16 Fontana, A., Antonioli, A., D'Amario Fernández, M. A., & Bottini, R. (2017). Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. *RSC Advances*, 7(47), 29446–57. <https://doi.org/10.1039/C7RA04681B>
- 17 Abreu J, Quintino I, Pascoal G, Postinger B, Cadena R, & Teodoro A. (2019). Antioxidant capacity, phenolic compound content and sensory properties of cookies produced from organic grape peel (*Vitis labrusca*) flour. *Int J Food Sci Technol.*, 54(4),1215–24. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14100>
- 18 Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., & Górecka, D. (2013). White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 389–95. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5774>
- 19 Palma, M.L., Nunes, M.C., Gameiro, R., Rodrigues, M., Gothe, S., Tavares, N., Pego, C., Nicolai, M., & Pereira, P. (2020) Preliminary sensory evaluation of salty crackers with grape pomace flour. *Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal*, 17(1), 33–43. <http://alies.pt/BBR%20Editions/Vol-17-1-2020/bbr.17.1.222.pdf>
- 20 Civille, G. V., & Ofstedal, K. N. (2012). Sensory evaluation techniques - make “good for you” taste “good”. *Physiology & Behavior*, 107(4), 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.015>
- 21 Kuchtová, V., Kohajdová, Z., Karovičová, J., & Lauková, M. (2018). Physical, textural and sensory properties of cookies incorporated with grape skin and seed preparations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(4), 309–17. <https://doi.org/10.2478/pjfn-2018-0004>
- 22 Kuchtová, V., Karovičová, J., Kohajdová, Z., Minarovičová, L., & Kimličková, V. (2016). Effects of white grape preparation on sensory quality of cookies. *Acta Chimica Slovaca*, 9(2), 84–8. <https://doi.org/10.1515/acs-2016-0014>
- 23 Civille, G.V., & Carr, B.T. (2015). Sensory evaluation techniques. (5th ed.). CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b19493>

## Use of chromium-enriched yeast in the manufacture of French bread

*Utilização de levedura enriquecida em crómio no fabrico de pão tipo Francês*

Carla Sá <sup>1,2</sup>, Ana Barata <sup>1</sup>, Carla Ramalho <sup>1</sup>, M. Cristiana Nunes <sup>1,3</sup>, Nelson Tavares\* <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias (ULHT), Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

\*corresponding author: nelson.tavares@ulusofona.pt

---

### Abstract

Bread enriched with chromium has been associated with improved glycemic control. The purpose of this study was the production of a bread with chromium (Cr III) -enriched yeast which maintained overall bread quality. A formulation of French bread was prepared using an inactive yeast enriched with Cr III for comparison against a control bread made with standard yeast. Yeast fermentation power and bread color and texture were evaluated. There were no differences in the color (crumb and crust) or the firmness of the bread crumb, despite a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the yellow tonality ( $b^*$ ) of the bread crumb. Regarding cohesiveness, samples present similar values but a significant difference ( $p < 0.05$ ) was detected between control and chromium breads. The average value of chromium in bread after processing was  $1.717 \mu\text{g/g}$  in dry samples. This study concludes that it is possible to produce French bread with chromium enriched - yeast without changing the technological process or dramatically affecting its color and texture characteristics.

**Keywords:** Yeast, chromium - enriched, French bread, texture, color

---

### Resumo

O pão enriquecido com levedura contendo crómio está associado à melhoria do controlo glicémico. Foi preparada uma formulação de pão tipo Francês usando uma levedura inativa enriquecida em Cr III e outra sem o metal, usada para efeitos de comparação e controlo. O presente trabalho tem como objetivo produzir um pão com levedura enriquecida em crómio trivalente (Cr III), mantendo a qualidade global do pão. Foi avaliado o poder de fermentação da levedura, a cor e a textura do pão. Em geral, as duas amostras de pão apresentam valores idênticos de cor (côdea e miolo) e firmeza (miolo), embora exista uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na tonalidade amarela ( $b^*$ ) do miolo. Em relação à coesividade, e embora os valores sejam similares, obteve-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o pão controlo e o pão com crómio. O valor médio do crómio no pão após o processamento foi de  $1,717 \mu\text{g/g}$  em amostra seca. Esta pesquisa conclui que é possível produzir pão tipo Francês com levedura enriquecida com Cr III sem alterar o processo tecnológico e sem afetar consideravelmente as suas características de cor e de textura.

**Palavras-chave:** Levedura enriquecida com crómio, pão tipo Francês, textura, cor

## Introduction

Bread is widely consumed as part of traditional diets and is an important source of dietary energy. Bread has been one of the bases of daily food, due to its nutritional characteristics and palatability, highly appreciated by consumers. The variety of cereal products and production techniques vary considerably around the world. The nutritional value of bread may increase depending on the mixture of other cereal flours or ingredients other than wheat flour (1).

Despite the variety of bread available on the market, consumers tend to prefer different types of bread in addition to the traditional white bread for some reasons, such as being healthy, having good taste, for the nutritional value and being recommended by some health professionals (1). In the current market context, and according to the European Food Safety Authority, the development of functional foods is a main priority to achieve beneficial nutritional properties and/or reduce risk factors for the development of a human disease (2). In this context, bread is an excellent vehicle for introducing functional ingredients. As a staple food, it contributes to the highest proportion of dietary carbohydrates and constitutes an inseparable part of the standard of the Mediterranean diet. In addition, consumption is a strategy to achieve better glycemic control, being beneficial to health (3,4).

Trivalent chromium, or chromium 3 (Cr III), is found in foods and dietary supplements and is used to reduce the risk of diabetes or to complement conventional medical therapies used to control diabetes (5), although the World Health Organization recommends that chromium III supplementation should not exceed 250 µg/day (6).

According to Racek *et al.* (7), bread with yeast enriched with Cr was beneficial in patients with type 2 diabetes mellitus, probably due to lower insulin resistance, leading to improved glucose tolerance. Yanni *et al.* (8) showed that bread enriched with Cr yeast (at a concentration of 500 µg Cr / 50 g of carbohydrates) is capable of reducing the postprandial glycemic response.

The objective of this work was to produce a bread with physical characteristics of color (crust and crumb) and crumb texture (firmness and cohesiveness) within the commercial standard of French bread, while taking advantage of the health benefits of including chromium in the diet of consumers.

## Introdução

O pão é amplamente consumido como parte das dietas tradicionais sendo uma importante fonte de energia dietética. O pão tem sido uma das bases da alimentação diária, devido às suas características nutricionais e à sua palatabilidade, altamente apreciado pelo consumidor. A variedade de produtos de cereais e técnicas de produção variam consideravelmente em todo o mundo. O valor nutricional do pão pode aumentar consoante a mistura de outras farinhas de cereais ou de outros ingredientes para além da farinha de trigo (1).

Apesar da variedade de pães disponíveis no mercado, os consumidores tendem a preferir diferentes tipos de pão além do tradicional pão branco por alguns motivos, como ser saudável, ter bom gosto, pelo valor nutricional e ser recomendado por algum profissional de saúde (1). No contexto atual do mercado, e de acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), o desenvolvimento de alimentos funcionais é uma prioridade, para alcançar propriedades nutricionais benéficas e/ou reduzir um fator de risco de desenvolvimento de determinada doença humana (2). Neste contexto, o pão é um excelente veículo para introdução de ingredientes funcionais, já que é um alimento de grande consumo, contribuindo com a maior proporção de hidratos de carbono na alimentação e constitui uma parte inseparável do padrão da dieta Mediterrânea. Além disso, o seu consumo é uma estratégia para alcançar melhor controlo glicémico, sendo benéfico à saúde (3,4).

O crómio trivalente, ou crómio 3 (Cr III), encontra-se em alimentos e suplementos dietéticos e é usado para reduzir o risco de diabetes ou para complementar as terapias médicas convencionais usadas no controle do diabetes (5). A Organização Mundial da Saúde considera que a suplementação de crómio III não deve exceder 250 µg/dia (6).

De acordo com Racek *et al.* (7), o pão com levedura enriquecida com Cr foi benéfico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, provavelmente devido à menor resistência à insulina, levando à melhoria da tolerância à glucose. Yanni *et al.* (8) mostrou que o pão enriquecido com levedura de Cr (na concentração de 500 µg Cr / 50g de hidratos de carbono) é capaz de reduzir a resposta glicêmica pós-prandial.

O objetivo do presente trabalho é obter um pão com características físicas de cor (côdea e miolo) e de textura do miolo (firmeza e coesividade) dentro do padrão comercial do pão tipo Francês, com os benefícios da inclusão do crómio na dieta dos consumidores.

## Materials and methods

### Yeast Production

*Saccharomyces cerevisiae* enriched with Cr III, developed in a partner's laboratory, was grown in enriched medium. Lalmin® Cr2000 (Lallemand, Estonia) is a dry and inactive whole cellulose yeast product containing high levels of chromium. The yeast cream is pasteurized, roller dried, and ground to provide 2.0 - 2.4 mg Cr/g.

Based on the fact that Lalmin® Cr2000 contains 0.2% chromium (Source: [https // bio-lallemand.com / health-ingredients / products / lalminr-chromium /](https://bio-lallemand.com/health-ingredients/products/lalminr-chromium/)), 60 mg of this product will provide 120 µg of chromium, each bread produced (60 g of raw dough), according to the formulation in Table 1, will have approximately 0.2 mg of chromium.

### Preparation of Bread

The formulation of French bread is presented in Table 1. Initially, wheat flour T65 (Nacional), dry yeast (Instaferm), salt, Clean Label S500 improver (Puratos) and Lamin® Cr2000 (only use in the sample with Cr) were added to the kneader (Brettechnica, Portugal) and previously mixed (2 min), at low speed. The water was then added, and the mixture kneaded at the fastest speed, until it was smooth and elastic (10 min). After resting for 15 min, in the incubator (Ramalhos), at a temperature of 26°- 28° C, the dough was divided into 60 g pieces,

## Material e Métodos

### A Produção da Levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com Cr III, desenvolvida no laboratório de um parceiro, foi cultivada em meio enriquecido. O Lalmin® Cr2000 (Lallemand, Estónia) é um produto de levedura de celulose integral, seca e inativa, contendo níveis elevados de cromo. O creme de levedura é pasteurizado, seco com rolo e moído, fornecendo 2,0 - 2,4 mg Cr/g.

Tendo por base que o Lalmin® Cr2000 contém 0,2 % de cromo (Fonte: [https//bio-lallemand.com/health-ingredients/products/lalminr-chromium/](https://bio-lallemand.com/health-ingredients/products/lalminr-chromium/)), 60 mg deste produto fornecerá 120 µg de cromo, cada pão produzido (60 g de massa crua), conforme formulação da Tabela 1, possuirá aproximadamente 0,2 mg de cromo.

### Preparação do Pão

A formulação do pão tipo Francês está apresentada na Tabela 1. Inicialmente, a farinha de trigo T65 (Nacional), a levedura seca (Instaferm), o sal, o melhorante Clean Label S500 (Puratos) e o Lamin® Cr2000 (utilizado apenas na preparação da amostra contendo cromo) foram adicionados na amassadeira (Brettechnica, Portugal) e previamente misturados (2 min), na velocidade baixa. A água foi então adicionada e a mistura amassada na velocidade mais rápida, até atingir o ponto de véu (10 min). Depois de descansar por 15 min na incubadora (Ramalhos), à temperatura

**Table 1** - French bread formulation

**Tabela 1** - Formulação de pão tipo Francês.

Ingredients / Ingredientes	AControl		ACr	
	%	g	%	g
<b>Wheat flour T65 / Farinha de Trigo T65</b>	100	1000	100	1000
<b>Lalmin Cr2000 *</b>	-	-	0.3	3
<b>Dry yeast / Levedura seca</b>	1	10	1	10
<b>Water / Água</b>	60	600	60	600
<b>Salt / Sal</b>	1.8	18	1.8	18
<b>Clean label S500 / Melhorante S500</b>	0.5	5	0.5	5

moulded in the shape of French bread in the modeler (Brettechnica). After being placed on the baking sheets, the breads were left to rise for 60 min at 30° C in the incubator (Ramalhos, Portugal). Finally, with the help of a stylus, cuts were made in the breads and then they were baked in the oven (Ferneto, Portugal), preheated to 220° C (upper element) and 230° C (lower element), with low humidity level for 15 min. In the production of control breads, the same procedure was repeated, with the exception of the addition of Lalmin® Cr2000.

### *Sampling*

The bread samples were cut into 2 cm slices measured with a digital caliper (Platinum, United Kingdom). The ends of the bread were neglected, leaving only the central part. The analysis of texture and color were performed after cooling the breads on the day they were prepared.

### *Yeast fermentation power*

To determine the fermentative power of the yeast for the control and Cr samples, 40 g × 4 of dough was removed from each of the samples, after kneading. That quantity was placed in beakers for measuring the volume, left to incubate at 30° C, being removed and photographed at 30, 60, 90 and 120 min (4 beakers/ sample).

### *Color*

The color was measured using a Minolta CR-300 colorimeter (Minolta, Japan), equipped with a standard D65 illuminator and a phase angle of 2°. The results were expressed using the CIELab\* color system that uses Cartesian axes with three coordinates: L\*, which quantifies luminosity and ranges from zero (black) to 100 (white); a\*, to indicate the intensity of red and -a\* to indicate the intensity of green; b\* to indicate the intensity of yellow and -b\* to indicate the intensity of blue. The values of the coordinates a\* and b\* typically range from -60 to 60. Measurements were conducted under the same light conditions, using a white standard and fluorescent artificial light, at room temperature. Each sample was tested ten times for the crumb. Due to the lack of homogeneity in the color of the crust, the number of measurements for the crust was increased from 10 to 30.

de 26°– 28° C, a massa foi dividida em pedaços de 60 g e moldada em formato de pão Francês na modeladora (Brettechnica). Depois de colocados nas assadeiras, os pães ficaram a fermentar por 60 min a 30° C, na incubadora (Ramalhos, Portugal). Por fim, com auxílio de um estilete, foram feitos cortes nos pães e, em seguida, foram assados durante 15 min no forno (Ferneto, Portugal), com pouca humidade, pré aquecido a 220° C (teto) e 230° C (lastro). Na produção dos pães controlo, o mesmo procedimento foi repetido, com exceção da adição de Lalmin® Cr2000.

### *Amostragem*

As amostras de pão foram cortadas em fatias de 2 cm com o auxílio de um paquímetro digital (Platinum, Reino Unido). Foram desprezadas as pontas do pão, ficando apenas a parte central. As análises de textura e cor foram realizadas após o arrefecimento dos pães no dia da preparação.

### *Poder de fermentação da levedura*

Para a determinação do poder fermentativo da levedura na amostra controlo e na amostra com Cr, foram retiradas 40 g × 4 de massa crua de cada uma das amostras, após amassadura. Essa quantidade foi colocada em provetas para medição do volume, e deixada a incubar a 30° C, sendo retirada e fotografada aos 30, 60, 90 e 120 min (4 provetas/amostra).

### *Cor*

A cor foi medida usando um colorímetro Minolta CR-300 (Minolta, Japão), equipado com um iluminante padrão D65 e um ângulo de fase de 2°. Os resultados foram expressos usando o sistema de cores CIELab\* que utiliza eixos cartesianos com três coordenadas: L\*, que quantifica a luminosidade e varia de zero (preto) até 100 (branco); a\*, para indicar a intensidade de vermelho e -a\* para indicar a intensidade de verde; b\* para indicar a intensidade de amarelo e -b\* para indicar a intensidade de azul. Os valores das coordenadas a\* e b\*, normalmente, variam de -60 até 60. As medições foram conduzidas sob as mesmas condições de luz, usando um padrão branco e luz artificial fluorescente, à temperatura ambiente. Cada amostra foi testada dez vezes para o miolo. Devido à falta de homogeneidade da cor da cõdea, o número de medições na cõdea foi aumentado de 10 para 30.

The total color difference between the bread containing Cr and the AControl was calculated using the equation:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [\text{Eq. 1}].$$

#### *Texture*

The bread samples were cut into 2 cm slices with the aid of a digital caliper (Platinum). The texture was evaluated on a TA-XTplus texturometer (Stable MicroSystems, United Kingdom) equipped with a 5 kg load cell using Texture Profile Analysis (TPA). A cylindrical probe 19 mm in diameter (P19), a cross-head speed of 1 mm/s and a waiting time of 5 s between the two penetration cycles were used. The measurements were repeated ten times for each bread sample. Firmness and cohesiveness were the texture parameters used to discriminate different bread samples, as has been previously used by other authors (9,10). Firmness is the maximum resistance to penetration (N) and cohesiveness is related to the level of structure between the elements that take part in the bread structure (11).

#### *Chromium III analysis*

The measurement of Cr III was carried out using a validated methodology and used by Soares et al. (12) in bread samples after drying.

#### *Statistical analysis*

Data were presented by means (standard deviation), the Shapiro-wilk test was used to test the normality of the distribution of variables. The variables with normal distribution were tested using the student's *t* test. The  $b^*$  color of the crust did not present a normal distribution and was tested by the equivalent non-parametric test, the Mann-Whitney test. The data were analyzed using SPSS version 23.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA). Results were considered statistically significant when  $p$ -value < 0.05.

A diferença total de cor entre o pão com Cr e a amostra AControl foi calculada usando a seguinte equação

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [\text{Eq. 1}].$$

#### *Textura*

As amostras de pão foram cortadas em fatias de 2 cm com o auxílio de um paquímetro digital (Platinum). A textura foi avaliada num texturómetro TA-XTplus (Stable MicroSystems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg usando a Análise de Perfil de Textura (TPA). Utilizou-se uma sonda cilíndrica de 19 mm de diâmetro (P19), uma velocidade de 1 mm/s e um tempo de espera de 5 s entre os dois ciclos de penetração. As medições foram repetidas dez vezes para cada amostra de pão. Os parâmetros de textura utilizados para discriminar as amostras foram a firmeza e coesividade, tal como reportado noutros estudos realizados em pão (9,10). A firmeza corresponde à resistência máxima à penetração da sonda (N) e a coesividade está relacionada com o nível de estruturação entre os elementos responsáveis pela estrutura do pão (11).

#### *Doseamento do Crómio III*

O doseamento do Cr III foi realizado com metodologia validada e usada por Soares et al. (12) em amostras de pão após secagem.

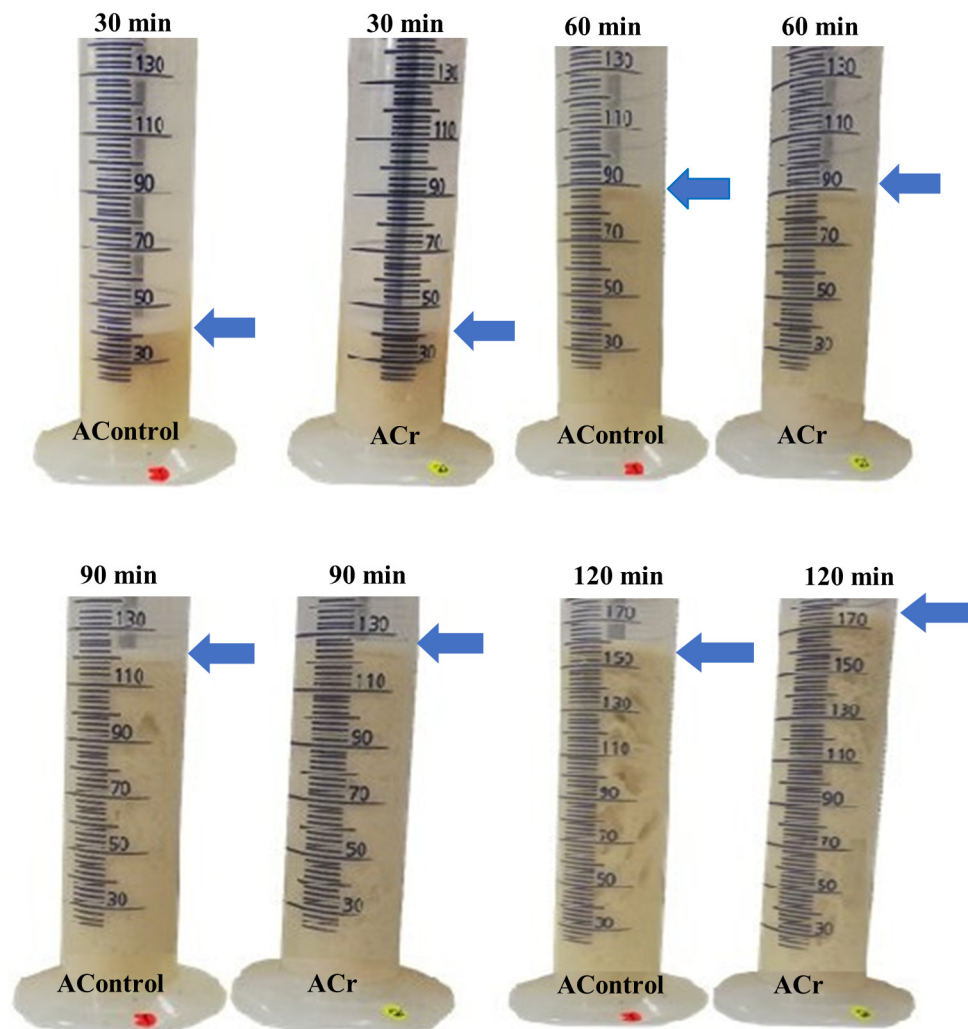
#### *Análise estatística*

Os dados foram apresentados por média (desvio padrão), o teste de Shapiro-wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis. As variáveis com distribuição normal foram testadas usando o *t* teste de student. A variável  $b^*$  da cor da crosta, não apresentou distribuição normal e foi testada pelo teste não paramétrico equivalente, o teste de Mann-Whitney. Os dados foram analisados pelo SPSS versão 23.0 (IBM Inc., Armonk, NY, EUA), sendo considerado um resultado com significado estatístico, quando  $p$ -value < 0,05.

**Table 2** - Volume of the dough, in mL, after 30, 60, 90 and 120 min of fermentation in the incubator at 30°C, for the control sample (AControl) and the sample with chromium (ACr).

**Tabela 2** - Volume da massa, em mL, após 30, 60, 90 e 120 min de fermentação, em incubadora a 30° C, para a amostra controlo (AControl) e a amostra com crómio (ACr).

Fermentation time / Tempo fermentação (min)	30	60	90	120
AControl (mL)	40	90	120	160
ACr (mL)	40	90	124	176



**Figure 1** - Photographic register of dough growth at 30 min, 60 min, 90 min and 120 min, after leavening at 30° C in the incubator.

**Figura 1** - Registo fotográfico do crescimento da massa aos 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, após levedar a 30° C na incubadora.

## Results and Discussion

The dough volume test that evaluates the fermentation power of yeast allows to determine if Cr III influences the fermentative capacity (13). The results obtained are showed in Figure 1 and in Table 2. It is possible to observe that in shorter fermentations (up to 60 min) the volume of the dough does not differ between the AControl and ACr samples. And in longer fermentations (90 and 120 min) the ACr sample has greater volume than the AControl. This is in agreement with the results obtained by Jialong et al. (14), where the growth of *S. cerevisiae* in the presence of chromium showed a lag phase much longer than in the absence of chromium. In terms of technological performance, this effect of chromium on yeast activity may be more interesting in long-fermentation breads, which are increasingly produced and consumed.

The results obtained for the crumb color, crust color and crumb texture parameters are presented in Tables 3 and 4.

## Resultados e Discussão

O teste de volume de massa que avalia o poder de fermentação da levedura permite determinar se o Cr III influencia a capacidade fermentativa (13). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1 e na Tabela 2. É possível observar que em fermentações mais curtas (até 60 min) o volume da massa não difere entre as amostras AControl e ACr. Em fermentações mais longas (90 e 120 min) a amostra ACr apresenta maior volume que a amostra AControl. Este resultado está de acordo com o estudo de Jialong et al. (14), where the growth of *S. cerevisiae* in the presence of chromium showed a lag phase much longer than in the absence of chromium. Em termos tecnológicos, este efeito do crômio na atividade da levedura poderá ser mais interessante em pães de fermentação longa, que são cada vez mais procurados e produzidos.

Os resultados obtidos para os parâmetros de cor do miolo e cõdea dos pães e para os parâmetros de textura do miolo são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

**Table 3** - Results for the bread color (crumb and crust) for the control sample (AControl) and the sample with chromium (ACr) ( $\pm$  standard deviation)

**Tabela 3** - Resultados das análise de cor no pão (miolo e cõdea) com crômio (ACr) e sem crômio (AControl) que serviu de controlo ( $\pm$ desvio-padrão).

	Crumb color / cor do miolo				Crust color / cor da cõdea			
	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	$\Delta E^*$	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	$\Delta E^*$
<b>AControl</b>	79.73 ( $\pm 2.20$ )	-0.20 ( $\pm 0.07$ )	13.12* ( $\pm 0.79$ )	-	72.19 ( $\pm 2.28$ )	7.91 ( $\pm 1.62$ )	34.66 ( $\pm 1.50$ )	-
<b>ACr</b>	80.09 ( $\pm 1.41$ )	-0.22 ( $\pm 0.18$ )	14.36* ( $\pm 0.55$ )	1.29	72.59 ( $\pm 2.79$ )	7.27 ( $\pm 2.54$ )	34.02 ( $\pm 2.74$ )	0.99

\*A significant difference ( $p$  value  $< 0.05$ ) was found between the samples for all color parameters.

\*Foi encontrada uma diferença significativa (para um valor de  $p < 0,05$ ) entre as amostras para todos os parâmetros de cor

**Table 4** - Results for the bread color (crumb and crust) for the control sample (AControl) and the sample with chromium (ACr) ( $\pm$  standard deviation)

**Tabela 4** - Resultados das análise de cor no pão (miolo e cõdea) com crômio (ACr) e sem crômio (AControl) que serviu de controlo ( $\pm$ desvio-padrão).

	Texture / Textura	
	Firmness / firmeza (N)	Cohesiveness / coesividade (Adimensional / sem dimensão)
<b>AControl</b>	0.591 ( $\pm 0.091$ )	0.826* ( $\pm 0.016$ )
<b>ACr</b>	0.680 ( $\pm 0.100$ )	0.810* ( $\pm 0.014$ )

\*A significant difference ( $p$  value  $< 0.05$ ) was found between the samples

\*Uma diferença significativa (para um valor de  $p < 0,05$ ) foi encontrada entre amostras.



Both samples have a high  $L^*$  parameter,  $a^*$  negative (green) and  $b^*$  positive (yellow), for the crumb. A significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between the AControl and the ACr sample for the  $b^*$  parameter.  $L^*$  and  $a^*$  values do not present significant differences ( $p > 0.05$ ). The color of the crumb is more directly related to the coloration of the ingredients, since it does undergo less reactions during baking, in contrast to the crust that undergoes Maillard reactions, changing it drastically (15). Thus, the sample produced with Cr has a slightly more yellow color, probably due to the coloring of Lalmin® Cr2000. Bread crust samples present high  $L^*$ ,  $a^*$  positive (red) and  $b^*$  positive (yellow), and they do not present significant differences ( $p < 0.05$ ) between ACr and the AControl, suggesting that the addition of Lalmin® Cr2000 does not affect the color, nor will it affect the consumer's choice. In addition, the literature indicates that the  $L^*$  brightness values of the crust around 70 are well accepted by consumers (15), which is in line with the results obtained ( $\sim 72$ ). For coordinates  $a^*$  and  $b^*$ , no patterns were found in the literature. The total color difference  $\Delta E^*$  between Acontrol and ACr is 1.29 in crumb and 0.99 in bread crust. Despite higher difference was obtained for crumb, several authors consider that the human eye only can differentiate colors when the total color difference  $\Delta E^* > 5$  [16].

Regarding texture, values obtained by the Texture Profile Analysis (TPA) may have been affected by the characteristic of the samples that had approximate size and shape, but not standardized. For firmness values there are no significant difference ( $p < 0.05$ ) between samples, and AControl cohesiveness is significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to ACr, despite the similarity values.

These results suggest that French bread enriched in chromium can be produced and consumed like traditional French bread, since they have very similar color and texture, both for crust and crumb.

From the nutritional point of view, according to the studies published by Yanni *et al.* (4), Costello *et al.* (5), and Raceck *et al.* (6), French bread made with yeast with the addition of chromium would have a differential related to its supply of chromium and its contribution in improving metabolism, thus the two food EFSA health claims approved for chromium III could be used (17). The average value of chromium in bread after processing was  $1.717 \mu\text{g/g}$  in dry samples. Yanni *et al.* (8) showed that the daily consumption of a yeast enriched with Cr with the same proportion of carbohydrates was able to assist in the treatment/control of diabetes by improving glucose tolerance and insulin resistance, with a

Ambas as amostras apresentam o parâmetro  $L^*$  elevado, parâmetros cromáticos  $a^*$  negativo (verde) e  $b^*$  positivo (amarelo), para o miolo. Verificam-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a coordenada  $b^*$ , que em média é maior na amostra ACr em relação ao AControl. A luminosidade  $L^*$  e a coordenada  $a^*$  não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) entre amostras. A cor do miolo está mais diretamente relacionada com as coloração dos ingredientes, uma vez que sofre menos alterações durante a cozedura, em contraste com a cõdea que sofre reações de *Maillard*, alterando-a consideravelmente (15). Desta forma, a amostra produzida com Cr apresenta uma cor ligeiramente mais amarela, provavelmente devido à coloração de Lalmin® Cr2000. A cõdea apresenta elevada luminosidade ( $L^*$ ), coordenada  $a^*$  positivo (vermelho) e coordenada  $b^*$  positivo (amarelo). Nenhum dos parâmetros de cor apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostras, sugerindo que a adição de Lalmin® Cr2000 não afeta a cor da cõdea, nem afetará a escolha do consumidor. Além disso, a literatura indica que os valores de luminosidade  $L^*$  da crosta em torno de 70 são bem aceites pelos consumidores (15), o que está de acordo com os resultados obtidos ( $\sim 72$ ). Para as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , não foram encontrados padrões na literatura. A diferença total de cor  $\Delta E^*$  entre Acontrol e ACr é 1,29 no miolo e 0,99 na cõdea do pão. Apesar de se confirmar uma maior diferença de cor no miolo, vários autores consideram que o olho humano só consegue discriminar as cores quando a diferença  $\Delta E^* > 5$  [16].

Em relação à textura, os valores obtidos recorrendo à Análise do Perfil de Textura (*Texture Profile Analysis* – TPA) podem ter sido afetados pela característica das amostras que tinham tamanho e forma aproximados, mas não padronizados. Verifica-se que embora os valores de firmeza sejam maiores na amostra ACr, não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre este pão e o controlo (AControl), enquanto que a coesividade do pão AControl é significativamente superior ao pão ACr ( $p < 0,05$ ), apesar dos valores serem semelhantes.

Os resultados obtidos sugerem que o pão de trigo tipo Francês enriquecido em crómio pode ser produzido e consumido como o pão Francês tradicional, uma vez que possuem propriedades semelhantes de cor e textura, quer ao nível da cõdea quer do miolo.

Do ponto de vista nutricional, conforme os estudos publicados por Yanni *et al.* (4), Costello *et al.* (5) e Raceck *et al.* (7), o pão Francês elaborado com uma levedura com adição de crómio terá um diferencial em

significant reduction in glycated hemoglobin (HbA1c), weight loss, and lower systolic blood pressure. Thus, this product may represent an excellent alternative to fiber bread, a current option to control postmeal plasma glucose, which has characteristics different than white bread and thus reduces the interest of some consumers (18,19).

## Conclusions

Although some studies have been published regarding the impact on human health of using yeast enriched with Cr (4,5,7,8), to the best of our knowledge, there are no studies regarding the impact of yeast enriched in chromium on the overall bread quality (texture and color). The results of our work demonstrate that it is possible to produce a bread using yeast enriched with Cr III without dramatic changes to its texture and color parameters. Based on these results, the development of this product for future marketing is of interest.

Nevertheless, our study had some limitations, including the use of French bread for the assessment of physical properties. Further, the breads produced were cut, resulting in a lack of homogeneity in the color of the crust. The number of measurements was increased to minimize this variability. Furthermore, despite the generally existing correlation between sensory results and the instrumental results obtained in the Texture Profile Analysis and with the colorimeter, it will be important to apply hedonic testing to these breads using a consumer panel, especially regarding flavour. Evaluations of the effects on glycemic index and the postprandial response are also suggested.

relação ao seu aporte de crômio, contribuindo para a melhoria do metabolismo, podendo ser utilizadas as duas alegações de saúde aprovadas pela EFSA para o crômio trivalente (17). O valor médio obtido para o crômio do pão em estudo após o processamento foi de 1,717 µg/g em amostra seca. Yanni et al. (8) mostraram que o consumo diário de um fermento enriquecido com Cr na mesma proporção de hidratos de carbono foi capaz de auxiliar no tratamento/controlo da diabetes, pela melhoria da tolerância à glucose, resistência à insulina, redução significativa na hemoglobina glicada (HbA1c), perda de peso e menor pressão arterial sistólica. Desta forma, este produto pode representar uma excelente alternativa ao pão de fibra, que até agora tem sido a opção no controlo da glicemia pós-prandial, mas que tem propriedades estruturais distintas do pão branco, tornando-o menos interessante para alguns consumidores (18,19).

## Conclusões

Há alguns estudos publicados sobre o impacto da adição de levedura enriquecida com crômio na saúde humana (4,5,7,8), mas não conhecemos nenhum estudo sobre o efeito da utilização de levedura enriquecida em crômio nas características de qualidade (textura e cor) de pão. Os resultados deste trabalho experimental demonstram que é possível produzir um pão com levedura enriquecida com Cr III sem alterar consideravelmente as propriedades de textura e cor do pão. Com base neste estudo, será de interesse desenvolver este produto para comercialização futura.

No entanto, este estudo teve algumas limitações, como o uso de pão Francês para a avaliação de propriedades físicas; os pães produzidos foram cortados, resultando em falta de homogeneidade na cor da crosta. Para minimizar essa instabilidade, o número de medições foi aumentado. Por outro lado, apesar da correlação geralmente existente entre os resultados sensoriais e os resultados instrumentais obtidos na Análise de Perfil de Textura e com o colorímetro, será importante submeter estes pães a um teste hedônico recorrendo a um painel de consumidor, especialmente devido ao atributo sabor. Sugere-se também a avaliação do índice glicémico e da resposta pós-prandial.

### **Authors Contributions Statement**

NT - conceptualization and study design; AB and CR - experimental implementation; CN - analysis; AB, CR, and CS - drafting, editing, reviewing, figures and graphics; NT- supervision and final writing.

### **Conflict of Interests**

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

### **Declaração sobre as contribuições do autor**

NT - desenho do estudo; AB e CR - implementação experimental; CN - Análises; AB, CR e CS - elaboração, edição, revisão, figuras e gráficos; NT - supervisão e redação final.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver relações financeiras ou pessoais que possam representar potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Demirtas B., Kaya A., Dagistan E. (2018). Consumers' Bread Consumption Habits and Waste Status: Hatay/Turkey Example. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6 (11), 1653-1661.
2. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.
3. Sajdakowska M., Gebiski J., Zakowska-Biemans S. (2019). Willingness to eat bread with health benefits: habits, taste and health in bread choice. *Public Health*, 167, 78-87.
4. Yanni A.E., Stamataki N., Stoupaki M. (2017). Cr-enriched yeast: beyond fibers for the management of postprandial glycemic response to bread. *European Journal of Nutrition*, 56 (4), 1445-53.
5. Costello R.B., Dwyer J.T., Bailey R.L. (2016). Chromium supplements for glycemic control in type 2 diabetes: limited evidence of effectiveness. *Nutrition Reviews*, 74 (7), 455-68.
6. World Health Organization (1996). Trace elements in human nutrition, (A Report of a re- evaluation of the role of trace elements in human health and nutrition). Geneva.
7. Racek J., Sindberg C.D., Moesgaard S. (2013). Effect of chromium-enriched yeast on fasting plasma glucose, glycated haemoglobin and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes mellitus treated with insulin. *Biological Trace Element Research*, 155 (1), 1-4.
8. Yanni A.E., Stamataki N.S., Konstantopoulos P. (2018). Controlling type-2 diabetes by inclusion of Cr-enriched yeast bread in the daily dietary pattern: a randomized clinical trial. *European Journal of Nutrition*, 57 (1), 259-67.
9. Nunes M.C., Graça C., Vlasisavljevic S., Tenreiro A., Sousa I., Raymundo A. (2020). Microalgae cell disruption: Effect on the bioactivity and rheology of wheat bread. *Algal Research*, 45, 101749.
10. Nunes M.C., Fernandes I., Vasco I., Sousa I., Raymundo A. (2020). Tetraselmis chuii as a sustainable and healthy ingredient to produce gluten-free bread: Impact on structure, colour and bioactivity. *Foods*, 9, 579.
11. Bourne M. (2002). *Food Texture and Viscosity*, 2nd ed.; Academic Press: London, UK.
12. Soares, M.E., Vieira E., Bastos M.L. (2009). Chromium Speciation Analysis in Bread Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2), 1366-1370.
13. De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Leroy F. (2017). Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 49-160.
14. Jianlong W., Zeyu M., Xuan Z. (2004). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress. *Process Biochemistry*, 39 (19), 1231-1235.
15. Johann V. (2018). O padrão de qualidade do pão francês na visão dos consumidores do Rio Grande do Sul. Retrieved February 20, 2021, from: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/174913/00106181859.pdf?sequence=1>
16. Francis F.J., Clydesdale F.M. (1975). *Food Colorimetry: Theory and Applications*; The AVI Publishing Company Inc.: Westport, CT, USA.
17. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012, establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
18. Laukova M., Kohajdova Z., Karovicova J. (2017). Effects of cellulose fiber with different fiber length on rheological properties of wheat dough and quality of baked rolls. *Food Science and Technology International*, 23 (6), 490-9.
19. Blandino M., Sovrani V., Marinaccio F. (2013). Nutritional and technological quality of bread enriched with an intermediated pearled wheat fraction. *Food Chemistry*, 141 (3), 2549-57.

## General Toxicity screening of Royleanone derivatives using an *Artemia salina* model

*Avaliação da toxicidade geral de derivados de Roileanonas pelo ensaio de letalidade de Artemia salina*

Epole Ntungwe<sup>1,2</sup>, Vera M. S. Isca<sup>1,3</sup>, Ana María Díaz-Lanza<sup>2</sup>, Carlos A. M. Afonso<sup>3</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS – Center Research for Biosciences & Health Technologies, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Spain

<sup>3</sup>iMed.Ulisboa, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal

\*corresponding author: patricia.rijo@ulusofona.pt

---

### Abstract

Cancer is the second leading cause of death globally. World Health Organization recorded an estimated 9.6 million deaths attributed to cancer in 2018. There is an urgent need for new anticancer drugs with novel modes of action. Natural products remain a valuable source for the identification and development of novel treatment options for cancer. *Plectranthus* species are well-known medicinal species used extensively for the treatment of different illnesses. These species are rich in diterpenoids which are reported to be responsible for various pharmacological activities including cytotoxic activities. Brine shrimp (*Artemia salina*) is broadly used in lethality studies and this model is a convenient starting point for cytotoxicity study when screening for general toxicity of natural products. This assay is based on their ability to kill a laboratory cultured nauplii. In this work, we report the general toxicity of some derivatives from 6,7-dehydroroyleanone (**1**) and 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone (**2**) compounds. The *A. salina* bioassay is a simple, rapid, and low-cost test, and is very useful for preliminary assessment of general toxicity in natural products thereby guiding the determination of possible biological activities.

**Keywords:** *Artemia salina*, general toxicity, Royleanone, *Plectranthus*

---

### Resumo

O cancro é a segunda principal causa de morte no mundo, A Organização Mundial da Saúde registou cerca de 9,6 milhões de mortes atribuídas ao cancro em 2018. Assim existe uma grande urgência por novos fármacos anticancerígenos. Os produtos naturais continuam a ser uma importante fonte para a identificação e desenvolvimento de novos tratamentos para o cancro. O género *Plectranthus* engloba espécies de plantas bem conhecidas pelas suas propriedades medicinais e amplamente utilizadas no tratamento de algumas doenças. Estas plantas são ricas em diterpenóides, compostos estes que apresentam diversas atividades farmacológicas interessantes, incluindo efeitos citotóxicos. O camarão marinho (*Artemia salina*) é amplamente utilizado em estudos de letalidade e é um ponto de partida vantajoso para a pesquisa de toxicidade geral de produtos naturais. Este ensaio é baseado na capacidade que os produtos naturais apresentam para matar náuplios criados em laboratório. Neste trabalho relatamos a toxicidade geral de alguns derivados preparados a partir dos compostos 6,7-dehidroroileanona (**1**) e 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxiroileanona (**2**). O bioensaio de *A. salina* é um teste simples, rápido e de baixo custo, muito útil para a avaliação preliminar da toxicidade geral de produtos naturais, orientando assim para possíveis atividades biológicas.

**Palavras-chave:** *Artemia salina*, toxicidade geral, Roileanonas, *Plectranthus*

## Introduction

During the past three decades, there has been significant progress in both the understanding and treatment of cancer. However, cancer remains the second leading cause of non-communicable disease deaths in the world. In 2018, there were over 18 million new cancer cases and approximately 10 million people died from the disease globally (1,2).

Medicinal plants are considered potential sources for drug development and many novel products. Natural products play a relevant role in cancer therapy today. Substantial numbers of anticancer agents used in the clinic are either natural or derived from natural products from various sources such as plants, animals, and microorganisms (also of marine origin) (3,4). During the last few decades, a wide range of cytotoxic agents were discovered from plants, and some of these are used as anti-cancer drugs. Paclitaxel (Taxol), for example, one of the most known chemotherapy drugs of natural origin, was derived from the bark of *Taxus brevifolia* and is one of the most active cancer chemotherapeutic drugs (5).

*Artemia salina*, commonly known as brine shrimp, is a tiny halophilic invertebrate belonging to the Phylum Arthropoda and Subphylum Crustacean, and play an important role in saline aquatic and marine ecosystems. In addition to usage as feedstuff in aquaculture, it is also highly valued for its larvae's application in toxicity detection (6). *A. salina* has gained popularity as a test organism for short-term toxicity testing because of its ease of culture, short generation time, and cosmopolitan distribution (7). In addition, its dormant brine shrimp eggs remain viable for many years and are therefore a suitable biological source (8). Other advantages of using brine shrimp in toxicity testing include (i) rapidity (i.e. 28–72 h from hatching to the first endpoint), (ii) cost-effectiveness, (iii) the availability of nauplii hatched from commercial durable cysts (eggs) (i.e., homogeneity of the population, availability all-year-round without the necessity of culturing) (9). Its use as a test organism is based on cellular mechanisms that may occur via necrosis, characterized by loss of membrane integrity, death of cell or apoptosis, a genetic program of controlled cell death (10). The significant correlation between the brine shrimp assay and *in vitro* growth inhibition of human solid tumor cell lines demonstrated by the National Cancer Institute (NCI, USA) further boosts the use of *A. salina* for general toxicity testing (11–14). This correlation is significant because it shows the value of this bioassay as a pre-

## Introdução

Durante as últimas três décadas, houve um progresso significativo na compreensão e tratamento do cancro. No entanto, o cancro continua a ser a segunda causa de morte por doenças não transmissíveis no mundo. Em 2018, havia mais de 18 milhões de novos casos de cancro e aproximadamente 10 milhões de pessoas morreram da doença, em todo o mundo (1,2).

As plantas medicinais são importantes fontes de obtenção no desenvolvimento de novos medicamentos e produtos. Os produtos naturais desempenham um papel relevante no tratamento do cancro, com um número substancial de agentes anticancerígenos, de uso clínico atual, provenientes de origem natural ou derivados de produtos naturais, de várias fontes, como plantas, animais e microrganismos (também de origem marinha) (3,4). Durante as últimas décadas, uma vasta gama de agentes citotóxicos foi descoberta em plantas, alguns dos quais são utilizados atualmente no tratamento do cancro. O paclitaxel (Taxol), por exemplo, obtido a partir da casca de *Taxus brevifolia*, é um dos quimioterápicos mais conhecidos de origem natural em quimioterapia e dos mais ativos (5).

*Artemia salina*, popularmente conhecido como artémia, é um minúsculo invertebrado halófilo pertencente ao Filo Arthropoda e Subfilo Crustáceo, que desempenha um papel importante nos ecossistemas salinos aquáticos. Além do seu uso como alimento na aquicultura, também é altamente valorizado pelo seu uso de larvas na avaliação da toxicidade geral (6). O uso de *A. salina* ganhou ênfase em estudos de triagem de toxicidade, de curto prazo. Isso deve-se à sua facilidade de cultura, curto tempo de geração e distribuição cosmopolita (7). Além disso, os ovos de artémia permanecem viáveis por muitos anos e são, portanto, uma fonte biológica adequada (8). Outras vantagens do uso de artémia em testes de toxicidade incluem: (i) rapidez (ou seja, 28-72 h desde a eclosão do ovo até o primeiro ponto final); (ii) custo-benefício; (iii) a disponibilidade de náuplios nascidos de cistos duráveis comerciais (ovos) (ou seja, homogeneidade da população e disponibilidade durante todo o ano, sem a necessidade de cultivo) (9). O seu uso como organismo-teste é baseado em mecanismos celulares que podem ocorrer via necrose, caracterizada pela perda da integridade da membrana, morte celular ou apoptose, programa genético de morte celular controlada (10). O National Cancer Institute (NCI, EUA) evidenciou uma correlação significativa entre o ensaio de artémia e a inibição do crescimento *in vitro* de linhas de células tumorais sólidas humanas,

screening tool for antitumor drug research (15–17). In the present study, we evaluated the general toxicity of 6,7-dehydroroyleanone (**1**) and 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone (**2**) derivatives using the *A. salina* model.

## Materials and Methods

### Plant Material

The plant materials, *P. madagascarensis* Benth. and *P. grandidentatus* Gürke were cultivated in Parque Botânico da Tapada da Ajuda (Instituto Superior Agrário, Lisbon, Portugal) from cuttings obtained from the Kirstenbosch National Botanical Garden (Cape Town, South Africa). The extraction and isolation processes of compounds **1** and **2** (Figure 1) were performed according to Garcia C. *et al.*, 2018 (19) and Bernardes C.E.S. *et al.*, 2018 (20), respectively.

### Reaction Procedures

The reactions, purification, identification, and stability of royleanone derivatives were carried out and previously reported in the study of Garcia *et al.* 2020 (21), Schemes 1 and 2.

o que apoia fortemente o uso do modelo de *A. salina* em testes de toxicidade geral (11–14). Isso é significativo porque mostra o valor deste bioensaio como uma ferramenta de pré-triagem para a pesquisa de fármacos antitumorais (15–18). No presente estudo, a toxicidade geral de dezassete derivados obtidos a partir de 6,7-dehidrooileanona (**1**) e de 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxioileanona (**2**) foi avaliada no ensaio de letalidade de *A. salina*.

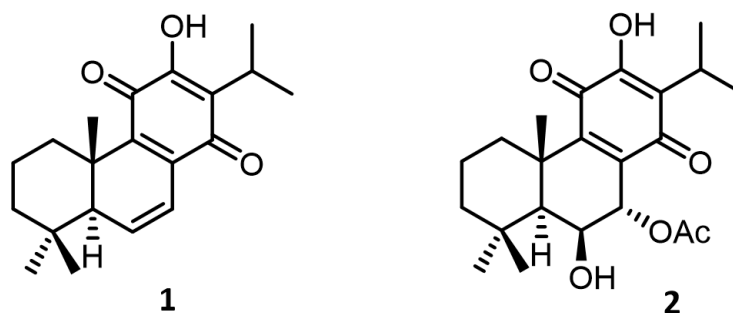
## Materiais e Metodos

### Material vegetal

As plantas *P. madagascarensis* Benth e *P. grandidentatus* Gürke foram cultivadas no Parque Botânico da Tapada da Ajuda (Instituto Superior Agrário, Lisbon, Portugal) a partir de estacas obtidas do *Kirstenbosch National Botanical Garden* (Cidade do Cabo, África do Sul). Os processos de isolamento e extração dos produtos naturais **1** e **2** (Figura 1) foram realizados segundo Garcia C. *et al.*, 2018 (19) e Bernardes C.E.S. *et al.*, 2018 (20), respetivamente.

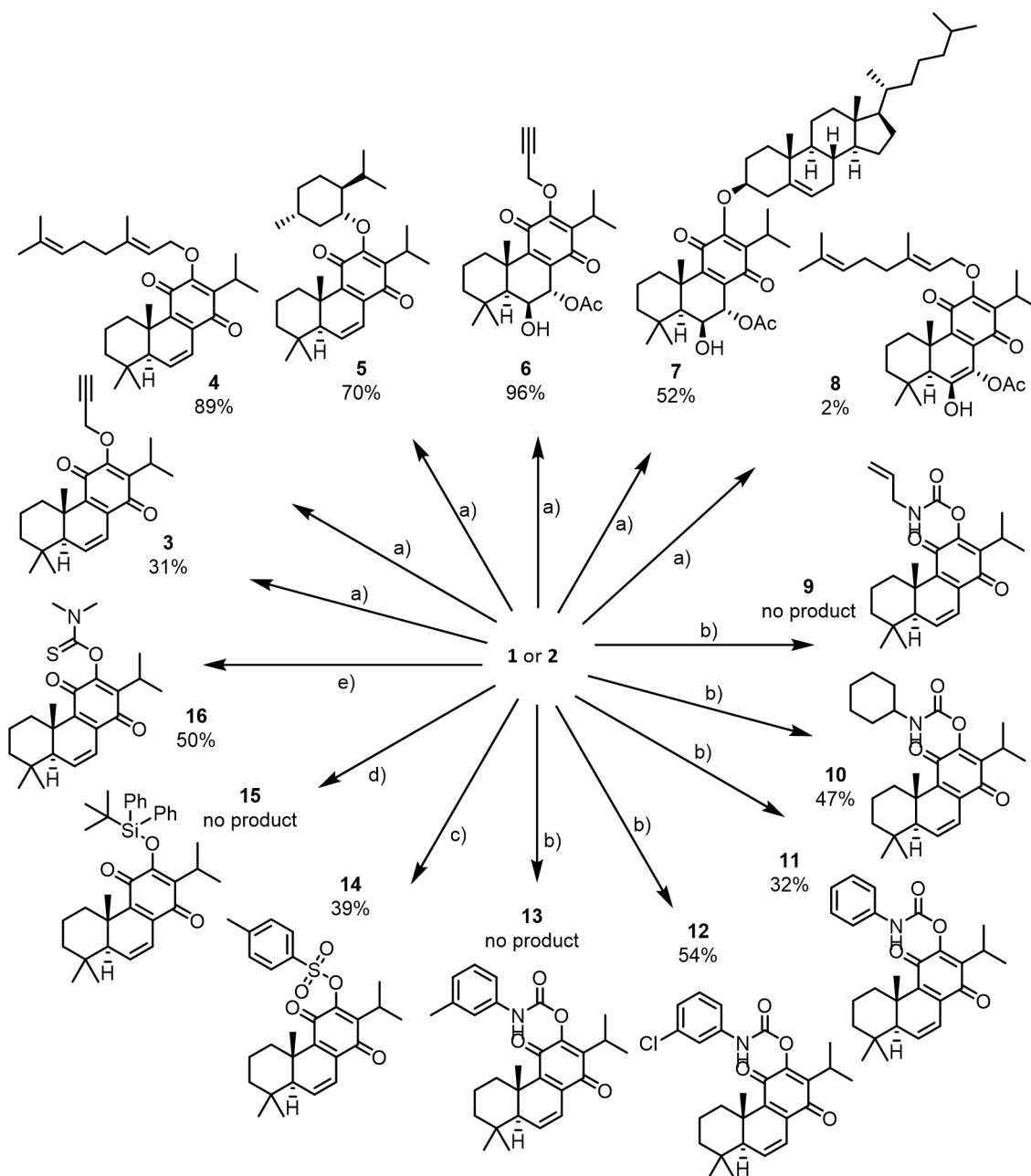
### Procedimentos das Reações

As reações e a purificação, identificação e estabilidade dos derivados de roileanona foram realizadas no estudo de Garcia *et al.* 2020 (21), Esquemas 1 e 2.



**Figure 1** -6,7-dehydroroyleanone (**1**) and 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone (**2**)

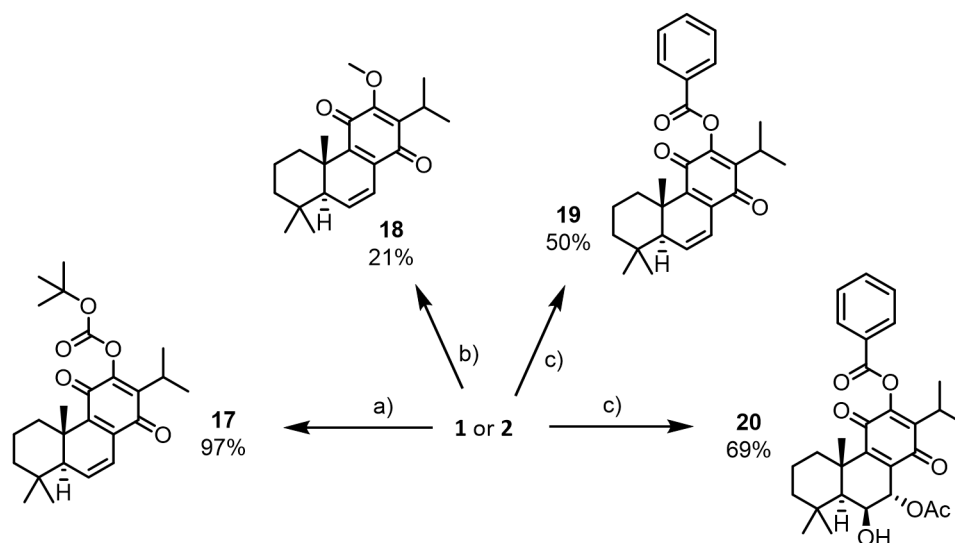
**Figura 1.** 6,7-dehidrooileanona (**1**) e 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxioileanona (**2**)



**Scheme 1** - Reactions of natural products **1** and **2** that produce unstable derivatives: a) Triphenylphosphine (5 eq.), DIAD (5 eq.), corresponding alcohol (5 eq.), and dry THF, under atmosphere inert, derivatives **3** to **8**; b) DMAP (5 eq.), corresponding isocyanate (in excess), and dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , under inert conditions, expected derivatives **9** to **13**; c) triethylamine (4.5 eq.), DMAP (0.3 eq.), *p*-toluenesulfonyl chloride (3 eq.), and dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , derivative **14**; d) imidazole (2 eq.), TBDPSCI (in excess), and dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , expected derivative **15**; e) dimethylthiocarbamoyl chloride (1.2 eq.), NaH (1 eq.), NaI (0.5 eq.), and THF, derivative **16**.

**Esquema 1** - Reações dos produtos naturais **1** e **2** que conduziram a derivados instáveis: a) Trifenilfosfina (5 eq.), DIAD (5 eq.), álcool correspondente (5 eq.) e THF seco, sob atmosfera inerte, derivados esperados **3** to **8**; b) DMAP (5 eq.), isocianato correspondente (em excesso) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, sob atmosfera inerte, derivados esperados **9** to **13**; c) trietilamina (4.5 eq.), DMAP (0.3 eq.), cloreto de *p*-toluenosulfonil (3 eq.) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, derivado **14**; d) imidazole (2 eq.), TBDPSCI (em excesso) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, derivado esperado **15**; e) cloreto de dimetiltiocarbamoilo (1.2 eq.), NaH (1 eq.), NaI (0.5 eq.) e THF, derivado **16**.





**Scheme 2** - Reactions of **1** and **2** that afford stable derivatives: a) DMAP (0.5 eq.), Boc<sub>2</sub>O (2.2 eq.), and dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, derivative **17**; b) CH<sub>3</sub>I (8.4 eq.), Ag<sub>2</sub>O (8.4 eq.), and dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, derivative **18**; c) Pyridine (12 eq.), benzoyl chloride (12 eq.), and dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, derivatives **19** and **20**.

**Esquema 2** - Reações de **1** e **2** que originaram derivados estáveis: a) DMAP (0.5 eq.), Boc<sub>2</sub>O (2.2 eq.) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, derivado **17**; b) CH<sub>3</sub>I (8.4 eq.), Ag<sub>2</sub>O (8.4 eq.) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, derivado **18**; c) Piridina (12 eq.), cloreto de benzoilo (12 eq.) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, derivados **19** e **20**.

#### Assessment of preliminary toxicity - Brine shrimp lethality bioassay

Samples of each tested compound were prepared at a concentration of 100 ppm in a salt medium (Brine shrimp salt obtained from JBL GmbH and Co. KG, D-67141, Neuhofen Germany) at a concentration of 35 g/L. A 24-well plate was used, and around 10 to 15 larvae were added to each well containing salt medium. Afterward, each compound was added (100 µL) to the corresponding wells, and the plate was stored for 24 h at 25°C. After 24 h, the number of dead larvae in each well was recorded. To determine the total number of larvae in each well, death was induced on the remaining living larvae by adding potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) at 1 mg/mL.

After 24 h, all dead larvae were counted and the mortality rate (%) was determined according to Equation 1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) at the same concentration of the samples (100 ppm) was used as a negative control. Four replicates were used for each test, and the assay was performed in triplicate.

$$\text{Mortality Rate (\%)} = \frac{(\text{Total } A. \text{ salina} - \text{Living } A. \text{ salina})}{(\text{Total } A. \text{ salina})} \times 100 \quad [\text{Eq. 1}]$$

#### Avaliação da toxicidade geral – Bioensaio de letalidade de Artémia

As amostras analisadas foram preparadas a uma concentração de 100 ppm, em meio salino (Sal para camarão marinho adquirido a JBL GmbH and Co. KG, D-67141 Neuhofen, Alemanha) à concentração de 35g/L. Numa placa de 24 poços, colocaram-se aproximadamente 10 a 15 larvas, em meio salino, em cada poço. De seguida, cada composto foi adicionado (100 µL) ao poço correspondente e a placa armazenada por 24h a 25°C. Após 24h, o número de larvas mortas em cada poço foi registado. De modo a determinar o número total de larvas em cada poço, a morte das larvas vivas remanescentes foi induzida, pela adição de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) a 1 mg / mL.

Após 24h, todas as larvas mortas foram contadas e a taxa de mortalidade (%) determinada de acordo com a Equação 1. O controlo negativo utilizado foi o dimetilssulfóxido (DMSO), na mesma concentração das amostras (100 ppm). Quatro réplicas foram usadas para cada teste, e o ensaio foi realizado em triplicado.

$$\text{Taxa de letalidade (\%)} = \frac{(A. \text{ salina total} - A. \text{ salina vivos})}{(A. \text{ salina total})} \times 100 \quad [\text{Eq. 1}]$$

### Statistical Analysis

The results were expressed as the mean value  $\pm$  SD. Comparisons were performed within groups by the analysis of variance using the ANOVA test. Significant differences between control and experimental groups were assessed by the SigmaStat software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A probability level  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## Results and discussion

### Hemi-synthesis of royleanone derivatives

Several hemi-synthetic reactions were performed to prepare a small library of compounds of enhanced cytotoxic potential. Both natural compounds **1** and **2** (Figure 1) were subjected to short-time microwave-assisted Mitsunobu and benzylation reactions. Natural compound **2** was also subjected to a carbamoylation, tosylation, methylation, and introduction of Boc (*tert*-butyloxycarbonyl) and TBDPS (*tert*-butyldiphenylsilyl) groups. The predicted structures and the isolated derivatives (**3** to **20**) are shown in Schemes 1 and 2.

The introduction of Boc group (**17**), methylation (**18**), and benzylation (**19** and **20**) reactions were accomplished with success, affording pure products with overall good yields (97% for derivative **17**, 28% for methylated derivative **18**, and 50% and 69% for benzylation derivatives **19** and **20**, respectively), scheme 2. Unfortunately, products **3** to **16** (Scheme 1) displayed a high rate of decomposition, occurring especially after isolation.

### Evaluation of general toxicity using *A. salina* model

Although some of the expected derivatives were not formed due to their chemical (in)stability, the general toxicity of all the obtained derivatives was assessed. The general toxicity was assessed through the brine shrimp lethality bioassay. **Figure 2** illustrates the mortality rate (%) of *A. salina* after 24 h of exposure to the diterpenoid compounds tested.

According to the results, natural product **1** displays moderate toxic activity (36.68% at 100 ppm). The unstable tosylation derivative (**9**) presented the highest mortality rate (81.87%). Overall, in agreement with this model, the chemical modifications induced in natural royleanone **1** structure through microwave-assisted Mitsunobu reactions, enhanced the toxic activity in all derivatives (**3** to **5**). Likewise, stable methylated **18** and

### Análise Estatística

Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvios padrão. As comparações foram realizadas dentro dos grupos pela análise de variância, utilizando o teste ANOVA. As diferenças significativas entre os grupos controle e experimental foram avaliadas pelo software SigmaStat (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). O nível de significância  $p < 0,05$  foi considerado para indicar significância estatística.

## Resultados e discussão

### Hemi-síntese de derivado de royleanone

Diversas reações hemi-sintéticas foram realizadas com o objetivo de preparar uma pequena biblioteca de compostos com elevado potencial citotóxico. Os compostos naturais **1** e **2** (Figura 1) foram submetidos a reações de Mitsunobu, assistidas por micro-ondas, e de benzoilação. Reações de carbamoilação, tosilção, metilação e introdução dos grupos Boc (*terc*-butiloxicarbonil) e TBDPS (*terc*-butildifenilsilil) também foram testadas no composto **2**. As estruturas previstas e os derivados isolados (**3** a **20**) estão apresentados nos Esquemas 1 e 2.

As reações de introdução do grupo Boc (**17**), metilação (**18**) e benzoilação (**19** e **20**) originaram produtos puros com bons rendimentos gerais (97% para o derivado **17**, 28% para o derivado metilado **18** e 50% e 69% para os benzoilados **19** e **20**, respetivamente), Esquema 2. Infelizmente, os produtos **3** a **16** (Esquema 1) apresentaram uma elevada taxa de decomposição, ocorrendo especialmente após o isolamento.

### Avaliação da toxicidade geral através do ensaio de letalidade de *A. salina*

Alguns dos derivados esperados não se formaram devido à sua instabilidade química. No entanto, avaliou-se a toxicidade geral de todos os derivados obtidos. A toxicidade geral foi avaliada através do bioensaio de letalidade de artémia. A Figura 2 ilustra a taxa de mortalidade (%) de *A. salina* após 24 h de exposição aos diterpenóides.

De acordo com os resultados apresentados, o produto natural **1** apresenta uma atividade tóxica moderada (36.68% à concentração de 100 ppm). O derivado tosilação instável (**9**) é responsável pela taxa de mortalidade mais elevada do ensaio (81.87%).

benzoylated **19** derivatives increased the toxicity of the original scaffold (**1**). The derivatives **9 - 11**, **10**, and **11** displayed the lowest mortality rate.

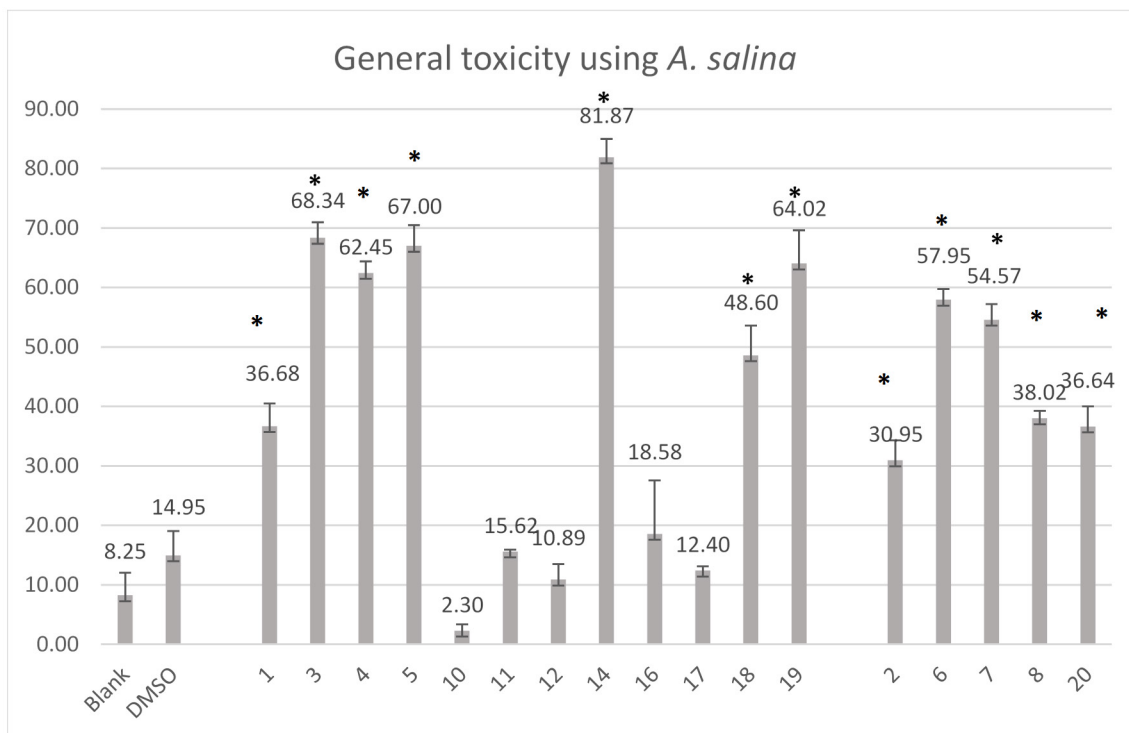
Natural royleanone **2** appears to be slightly less toxic than **1** (30.95% at 100 ppm), but similarly, the Mitsunobu derivatives increased the toxicity of the lead molecule (compounds **6** to **8**). The benzoylated product of **2** (compound **20**) also slightly increased the toxicity of the original scaffold.

Considering that only derivatives **17** to **20** were stable, that **18** was obtained with a lower yield, and that **17** displayed lower toxicity, this shows that compounds **19** and **20** (both esters) were the most promising of the targets produced.

De um modo geral, as modificações induzidas na estrutura do composto natural **1**, por reações de Mitsunobu assistidas por micro-ondas, conduziram a um aumento da toxicidade em todos os derivados (**3** to **5**). Do mesmo modo, os derivados estáveis **18** (metilado) e **19** (benzoiado) aumentaram a toxicidade verificada no composto de partida (**1**). Os derivados **9 - 11**, **10** e **11** apresentaram a menor taxa de mortalidade.

A roileanona natural **2** apresenta valores de toxicidade ligeiramente inferiores a **1** (30.95% à concentração de 100 ppm). À semelhança do que se verificou com **1**, os derivados de Mitsunobu (compostos **6** a **8**) obtidos a partir de **2** foram responsáveis por um aumento da toxicidade comparativamente com ao composto de partida. Adicionalmente, o produto benzoiado de **2** (composto **20**) aumentou ligeiramente a toxicidade verificada em **2**.

Considerando que apenas os derivados **17** a **20** são estáveis, o derivado **18** foi obtido com baixo rendimento e o **17** apresentou baixa toxicidade, os resultados demonstram que os compostos **19** e **20** (ambos ésteres) são os mais promissores.



**Figure 2** - Mortality rate (%) of *Artemia salina* after 24 h exposure to royleanones. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $p < 0.05$  comparison DMSO vs compounds.

**Figura 2** - Taxa de letalidade (%) de *Artemia salina* após 24 h de exposição às roileanonas. Os valores são expressos como a média  $\pm$  DP (n = 3). \*  $p < 0,05$  comparação DMSO vs compostos.

## Conclusions

The reactivity of two natural royleanones **1** and **2** was explored. Several hemi-synthetic reactions were performed, and the obtained products were limited by stability issues: the derivatives **3** to **16** tend to degrade after isolation. Successful results were obtained when performing methylation and benzoilation, as with the introduction of a BOC group, affording pure compounds (**17** to **20**), with overall good yields.

General toxicity using the *A. salina* model has been established for the obtained products. As such, products **3** to **8**, **14**, and **18** to **20** have increased the toxicity of the lead compound. Products **19** and **20** displayed the best results regarding their stability and high toxicity, thus suggesting that the formation of esters is a more convenient approach for future derivatives.

## Authors Contributions Statement

EN, VI - experimental and original writing; AD - visualisation; CA - methodology, supervision; PR - conceptualization, supervision, final writing

## Funding

Support for this work was provided by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through projects UIDP/04567/2020 e UIDB/04567/2020 and PhD grant SFRH/BD/137671/2018.

## Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interest.

## Conclusões

A reatividade de duas roileanonas naturais **1** e **2** foi estudada através de várias reações hemi-sintéticas. Os produtos obtidos apresentaram alguns problemas de estabilidade: os derivados **3** a **16** degradaram no processo de isolamento. No entanto foram obtidos produtos puros e estáveis, com bons rendimentos globais, nas reações de metilação, benzoilação e introdução do grupo BOC (**17** a **20**).

A toxicidade geral através do modelo de *A. salina* foi avaliada para os derivados preparados. Os derivados **3** a **8**, **14** e **18** a **20** aumentaram a toxicidade do composto natural de partida. Os produtos **19** e **20** apresentaram os melhores resultados quanto à estabilidade e elevada toxicidade, sugerindo que a formação de ésteres é uma abordagem mais conveniente para futuros derivados.

## Declaração Sobre as Contribuições do Autor

EN, VI - experimental e escrita original; AD - visualização; CA - metodologia, supervisão; PR - concepção, supervisão, edição final

## Financiamento

Os autores agradecem à FCT pelo apoio financeiro para este trabalho através dos projetos UIDP/04567/2020 e UIDB/04567/2020 e bolsa de Doutoramento SFRH/BD/137671/2018.

## Conflito de Interesses

Os autores não têm conflitos de interesse a reportar.

## References / Referências

1. World Health Organization (WHO), fact sheet on Cancer. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 5 February 2021).
2. Tobore T. O. (2019). On the need for the development of a cancer early detection, diagnostic, prognosis, and treatment response system. *Future science OA*, 6(2), FSO439. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0028>
3. Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365–378. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.017>
4. Taviano, M. F., Rashed, K., Filocamo, A., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Bisignano, C., Acquaviva, R., D'Arrigo, M., & Miceli, N. (2018). Phenolic profile and biological properties of the leaves of *Ficus vasta* Forssk. (Moraceae) growing in Egypt. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2210-0>
5. Seca, A., & Pinto, D. (2018). Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 263. <https://doi.org/10.3390/ijms19010263>
6. Zhang, Y., Mu, J., Han, J., & Gu, X. (2012). An improved brine shrimp larvae lethality microwell test method. *Toxicology mechanisms and methods*, 22(1), 23–30. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.583297>
7. Papadopoulos, A.I.; Lazaridou, E.; Mauridou, G.; Touraki, M. (2004). Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Marine Biology*, 144, 295–301, doi:10.1007/s00227-003-1203-8.
8. Ntungwe N, E., Domínguez-Martín, E. M., Roberto, A., Tavares, J., Isca, V., Pereira, P., Cebola, M. J., & Rijo, P. (2020). *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Current pharmaceutical design*, 26(24), 2892–2908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>
9. Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L.; Cicero, A.M.; Manfra, L. (2016) A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35–49, doi:10.1016/j.ecolind.2016.04.017.
10. Ntungwe N, E.; Marçalo, J.; Garcia, C.; Reis, C.; Teodósio, C.; Oliveira, C.; Oliveira, C.; Roberto, A. (2017) Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108, doi:10.19277/BBR.14.1.153.
11. Zengin, G., Ferrante, C., Senkardes, I., Gevrenova, R., Zheleva-Dimitrova, D., Menghini, L., Orlando, G., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Brunetti, L., Picot-Allain, C., Rengasamy, K. R., & Mahomoodally, M. F. (2019). Multidirectional biological investigation and phytochemical profile of *Rubus sanctus* and *Rubus ibericus*. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 127, 237–250. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.041>
12. Krstić, N. M., Matic, I. Z., Juranić, Z. D., Novaković, I. T., & Sladić, D. M. (2014). Steroid dimers-in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2014.06.005>
13. Olivares-Bañuelos, T., Gutiérrez-Rodríguez, A. G., Méndez-Bellido, R., Tovar-Miranda, R., Arroyo-Helguera, O., Juárez-Portilla, C., Meza-Menchaca, T., Aguilar-Rosas, L. E., Hernández-Kelly, L., Ortega, A., & Zepeda, R. C. (2019). Brown Seaweed *Egria menziesii*'s Cytotoxic Activity against Brain Cancer Cell Lines. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(2), 260. <https://doi.org/10.3390/molecules24020260>
14. Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., & Iglesias Buella, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
15. Gajardo, G. M., & Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. *Frontiers in physiology*, 3, 185. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185>
16. Arslanyolu, M.; Erdemgil, F. Z. (2006) Evaluation of the Antibacterial Activity and Toxicity of Isolated Arctiin From the Seeds of *Centaurea Sclerolepis*, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 35 (2), 103–109. [https://doi.org/10.1501/Eczfak\\_0000000052](https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000052)
17. Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S. M., & Cáceres, A. (2010). Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 897-903. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000029>
18. Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., & Iglesias Buella, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
19. Garcia, C., Silva, C. O., Monteiro, C. M., Nicolai, M., Viana, A., Andrade, J. M., Barasoain, I., Stankovic, T., Quintana, J., Hernández, I., González, I., Estévez, F., Díaz-Lanza, A. M., Reis, C. P., Afonso, C. A., Pesic, M., & Rijo, P. (2018). Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction. *Future medicinal chemistry*, 10(10), 1177–1189. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0239>
20. Bernardes, C., Garcia, C., Pereira, F., Mota, J., Pereira, P., Cebola, M. J., Reis, C. P., Correia, I., Piedade, M., Minas da Piedade, M. E., & Rijo, P. (2018). Extraction Optimization and Structural and Thermal Characterization of the Antimicrobial Abietane 7 $\alpha$ -Acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone. *Molecular pharmaceuticals*, 15(4), 1412–1419. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00892>
21. Garcia, C., Isca, V., Pereira, F., Monteiro, C. M., Ntungwe, E., Sousa, F., Dinic, J., Holmstedt, S., Roberto, A., Díaz-Lanza, A., Reis, C. P., Pesic, M., Candéias, N. R., Ferreira, R. J., Duarte, N., Afonso, C., & Rijo, P. (2020). Royleanone Derivatives From *Plectranthus* spp. as a Novel Class of P-Glycoprotein Inhibitors. *Frontiers in pharmacology*, 11, 557789. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.557789>
22. Bessa, C., Soares, J., Raimundo, L., Loureiro, J. B., Gomes, C., Reis, F., Soares, M. L., Santos, D., Dureja, C., Chaudhuri, S. R., Lopez-Haber, C., Kazanietz, M. G., Gonçalves, J., Simões, M. F., Rijo, P., & Saraiva, L. (2018). Discovery of a small-molecule protein kinase C $\delta$ -selective activator with promising application in colon cancer therapy. *Cell death & disease*, 9(2), 23. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0154-9>

## **Preliminary safety evaluation of n-butanol from the collagen extraction process and of collagen extract from *Oreochromis niloticus* (tilapia) skin oriented for dermocosmetics**

*Avaliação preliminar da segurança do n-butanol do processo de extração de colágeno e do extrato de colágeno da pele de Oreochromis niloticus (tilápia) para uso dermocosmético*

**Linda Sánchez-Tuesta<sup>1</sup>, Nataly Reátegui-Pinedo<sup>1</sup>, David Salirrosas<sup>1</sup>, Ana Lucía Morocho-Jácome<sup>2</sup>,  
Fernanda Daud Sarruf<sup>2</sup>, Renata Miliani Martinez<sup>2</sup>, Roberto Quevedo-León<sup>3</sup>, Ramiro Fiestas<sup>1</sup>, Carmen  
Ayala-Jara<sup>1</sup>, André Rolim Baby<sup>2\*</sup>, Zulita Adriana Prieto<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Trujillo. Juan Pablo II Av. s/n, Trujillo, Perú

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Universidad de Los Lagos. Fuschlocher Av. 1305, Osorno, Chile

\*corresponding authors: zprieto@unitru.edu.pe and andrerb@usp.br

---

### **Abstract**

Obtaining new cosmetic ingredients, mainly from sustainable sources, as novel excipients or even active compounds is noteworthy for the cosmetic industry to enhance new innovative dermocosmetics. Thus, it is essential to establish the safety of these new ingredients to avoid adverse events, mainly those associated with clastogenic effects from the chemical compounds used for collagen extraction. In this study, we evaluated solutions of chemical compounds used in the collagen extraction process from tilapia skin (*Oreochromis niloticus*). The cytotoxic and genotoxic effects of the solutions used in the collagen extraction process were 10.0, 1.0, 0.5, and 0.1% n-butanol. Solutions were evaluated by the *Allium* test and the comet assay in peripheral white blood cells. The residual water from the final skin wash in the pre-treatment phase and the 0.5% lyophilized collagen extract were also investigated. The absence of cytotoxic and genotoxic activity was demonstrated in the collagen extract, despite the fact that n-butanol showed DNA damage, both in the root cells of *Allium cepa* and in the white blood cells of human peripheral blood. Therefore, we note the necessity to carry out genotoxicity tests to guarantee the absence of contaminants in the collagen extract for cosmetic purposes.

**Keywords:** *Allium* test; collagen extraction; Comet assay; cytotoxicity; genotoxicity; *Oreochromis niloticus*

---

### **Resumo**

A obtenção de novos ingredientes cosméticos, principalmente de fontes sustentáveis, como excipientes ou mesmo compostos ativos, é notável para a indústria cosmética para fórmulas dermocosméticas inovadoras. Assim, é essencial estabelecer a segurança desses novos ingredientes para evitar eventos adversos, principalmente aqueles associados aos efeitos clastogênicos dos compostos químicos utilizados para extração de colágeno. Avaliamos soluções de um composto químico utilizado no processo de extração de colágeno da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos das soluções utilizadas no processo de extração de colágeno foram de 10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; e 0,025% de n-butanol. Estas foram avaliadas pelo teste de *Allium* e pelo ensaio do cometa em glóbulos brancos periféricos. Ademais, foram investigadas a água residual da última lavagem na fase pré-tratamento e o extrato de colágeno de tilápia liofilizado a 0,5%. A ausência de atividade citotóxica e genotóxica foi demonstrada no extrato de colágeno, apesar do n-butanol ter demonstrado dano ao DNA, tanto nas células radiculares de *Allium cepa* quanto nos glóbulos brancos do sangue periférico humano. Por isso, observamos a necessidade de realização de testes de genotoxicidade para garantir a ausência de contaminantes no extrato de colágeno para fins dermocosméticos.

**Palavras-chave:** Teste de *Allium*; extração de colágeno; ensaio de cometa; citotoxicidade; genotoxicidade; *Oreochromis niloticus*

## Introduction

Sustainable use of residual materials from aquatic organisms has been widely studied during the last decade, with interesting results (1,2). Since the origin and the extraction method exert a strong influence on the purity and yield of collagen, there are many reviews available regarding marine resources that discuss not only the factors that influence the collagen extraction but also the physical and biological properties, such as its thermal stability, amino acid composition, and safety as oriented for dermocosmetics (1-4).

Moreover, numerous bioactive peptides of collagen have been extracted from fish via chemical or enzymatic hydrolysis as a safer option in the development of cosmeceutical products. Among the principal activities, we have examined the antimicrobial, antioxidant, antiphotaging, photoprotective activities, and their potential application in the cosmetic area (2).

Indeed, there is a rising utilization of collagen from fish residuals for cosmetic applications since fish collagen has no risk in disease transmission to humans. For instance, some studies focused on wound healing applications with successful results as well as scar diminution (1,5–7). Fish collagen is principally derived from the skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) is highly appreciated for its biomedical and cosmetic uses due to particular physicochemical properties (8,9). The results of the biological evaluations of tilapia collagen demonstrated the absence of cellular toxicity and chromosomal aberrations, negative sensitivity tests, and acute systemic toxicity (10). Biocompatibility and regenerative activity in the treatment of deep second-degree burns have also been observed (11). The biological safety of collagen will depend on its purity; therefore, it is necessary to assess pretreatment procedures and methods of extraction.

The methods for extracting collagen from by-products of different animal origins are well established (10,12). To release non-collagen proteins, fats, and pigments, sodium hydroxide and n-butanol in proportions of 1:20 weight/volume (w/v) are commonly used in the first stage of treatment (13,14). After treatments at variable times with these chemical compounds, successive rinses are carried out to remove chemical residues infused within the extracted collagen or in the rinsing liquids. Some of these molecules, such as hydrogen peroxide (15) and n-butanol (16), represent a source for the environmental pollution and potential genotoxicity.

## Introdução

O uso sustentável de resíduos de organismos aquáticos foi amplamente estudado na última década com resultados interessantes (1,2). Uma vez que a origem e o método de extração exercem influência significativa sobre a pureza e rendimento do colágeno, há muitas revisões disponíveis sobre os recursos marinhos que discutem não apenas os fatores que influenciam a extração de colágeno, mas também suas propriedades físicas e biológicas, como sua estabilidade térmica, composição de aminoácidos e segurança orientada para dermocosméticos (1-4).

Além disso, inúmeros peptídeos bioativos de peptídeos de colágeno foram extraídos de peixes por hidrólise química ou enzimática, como opção mais segura no desenvolvimento de produtos cosmeceuticos. Entre as principais atividades, observam-se ação antimicrobiana, antioxidante, antifotoenvelhecimento, atividades fotoprotetoras e potencial aplicação na área cosmética (2).

De fato, há uma crescente utilização de colágeno de resíduos de peixes para aplicações cosméticas, uma vez que o colágeno de peixe não tem risco na transmissão de doenças para humanos. Por exemplo, alguns estudos se concentraram em aplicações de cicatrização de feridas com resultados bem-sucedidos, bem como diminuição da cicatrizes (1,5–7). Principalmente o colágeno de peixe derivado da pele da tilápia (*Oreochromis niloticus*) é altamente apreciado por seus usos biomédico e cosmético devido à propriedades físico-químicas particulares (8,9). Os resultados das avaliações biológicas do colágeno de tilápia demonstraram a ausência de toxicidade celular e aberrações cromossômicas, negativa em testes de sensibilidade e toxicidade sistêmica aguda (10). Também foram observadas a biocompatibilidade e a atividade regenerativa em queimaduras profundas de segundo grau (11). A segurança biológica do colágeno dependerá de sua pureza; portanto, é necessário avaliar os procedimentos de pré-tratamento e os métodos de extração.

Os métodos de extração de subprodutos de colágeno de diferentes animais são bem estabelecidos (10,12). O estágio anterior de tratamento, realizado para separar proteínas não colágenas, gorduras e pigmentos comuns, usam hidróxido de sódio e n-butanol em proporções de 1:20 peso/volume (p/v) (13,14). Após os tratamentos por períodos variáveis com esses compostos, sucessivos enxágues são realizados para descartar resíduos impregnados no colágeno extraído ou nos líquidos de lavagem. Essas moléculas representam

Biosafety of raw materials in cosmetic industries is mandatory. It is also important to ensure that the concentrations of chemical substances used during extraction processes for cosmetic (ingredient) use must be eliminated or reduced (17). For collagen extraction, caution in the elimination of any remaining n-butanol in the by-products of the collagen raw material (14) is required.

Even when an absence of butanol mutations is reported using the Ames assay (16), additional tests are needed to confirm the results and to specify the utilized concentrations. Current research shows that a single assay is not sufficient to exclude a genotoxic substance, even when the result has been negative (17–20). In this research, we evaluated the safety of chemical solutions of n-butanol (used in the extraction process), residual water from washes and collagen extract from *O. niloticus* skin itself with cosmetic purposes, using cytotoxic and genotoxic assays by *Allium* and comet tests.

## Materials and Methods

### *Biological material*

- 1) *Allium cepa* bulbs, medium in size, with germinal disk between 1 and 2 cm.
- 2) Peripheral blood lymphocytes obtained from two healthy male donors, aged 25 and 38 years. The donors were non-smokers and did not consume drugs. (Nº: 001-2020/CEI-UNT).
- 3) Tilapia (*Oreochromis niloticus*), 12 months old (30 fish, 450 ± 35.0 g).

### *Chemical products*

n-Butanol (1-butanol CAS 71-36-3), NaOH, acetic acid, hydrogen peroxide, NaCl, disodium EDTA, Tris HCl, Triton X-100 and DMSO from Sigma-Aldrich were used. Propidium iodide and SYBR Gold from Invitrogen, USA were also used.

uma fonte poluente para o meio ambiente e potencial genotoxicidade, como o peróxido de hidrogênio (15) e n-butanol (16).

A biossegurança das matérias-primas na indústria cosmética é obrigatória. Também é importante assegurar que as concentrações de substâncias químicas utilizadas durante os processos de extração de ingredientes cosméticos sejam eliminadas ou reduzidas (17), como o composto químico n-butanol. Para a extração de colágeno, é necessária cautela na eliminação do n-butanol, utilizado para a remoção de gorduras que permanecem nos subprodutos da matéria-prima de colágeno (14).

Apesar da ausência de mutações causadas pelo butanol no ensaio Ames (16), testes adicionais são necessários para confirmar esses resultados e especificar as concentrações utilizadas. Pesquisas atuais demonstram que um único ensaio não é suficiente para excluir uma substância genotóxica, mesmo quando o resultado foi negativo (17–20). Nesta pesquisa, avaliou-se a segurança de soluções químicas de n-butanol (utilizado no processo de extração), água residual de lavagens e extrato de colágeno da pele de *O. niloticus* para fins dermocosméticos, utilizando ensaios citotóxicos e genotóxicos por testes de *Allium* e cometa.

## Material e Métodos

### *Material biológico*

- 1) Bulbos de *Allium cepa* de tamanho médio, com disco germinal entre 1 e 2 cm.
- 2) Linfócitos sanguíneos periféricos obtidos de dois doadores masculinos saudáveis, não fumantes, que não consumiram drogas, com idades entre 25 e 38 anos (Nº: 001-2020/CEI-UNT).
- 3) Tilápia (*Oreochromis niloticus*), 12 meses de idade (30 peixes, 450 ± 35,0 g).

### *Produtos químicos*

n-Butanol (1-butanol CAS 71-36-3) NaOH, ácido acético, peróxido de hidrogênio, NaCl, EDTA dissódico, Tris HCl, Triton X-100 e DMSO da Sigma-Aldrich foram utilizados. Também foram utilizados iodeto de propídeo e SYBR Gold da Invitrogen, USA.



*Obtaining collagen from tilapia (O. niloticus)*

Collagen was obtained by extraction in acetic acid (ASC), according to a recent report (9). After successive washes with an abundance of distilled water, the tilapia skin was pre-treated with 0.1M NaOH (1:20 w/v) for 24 h, followed by treatment with n-butanol at 10% (1:20 w/v). Ten washes with an abundance of distilled water were performed, followed by collagen extraction in 0.5M acetic acid for 48 h. The entire procedure was conducted at 4.0 °C, with recovered collagen vacuum filtered with a filter paper (Whatman N° 4), and then lyophilized.

*Allium test*

The onion bulbs were immersed in water, confirming that the germinal disk was fully immersed. Testing was initiated when (all of) the roots reached between 1 and 2 cm in length. Successive tests of n-butanol at concentrations of 10.0; 1.0; 0.5; 0.1; 0.05 and 0.025% were performed to determine both viability and activity of the cells. The growing roots were then exposed to either n-butanol, residual water from the final (10<sup>th</sup>) rinse of the pretreatment of the collagen extraction process, 0.5% collagen in distilled water, and purified water, as a control. After 6 h of treatment, the apical meristems were cut from the roots, fixed in an ethanol:acetic acid solution (3:1 v/v) and held at -4.0 °C for a minimum of 24 h. Samples were stained with 1.0% acetic orcein 1N: HCl (9: 1 v/v) for 30 minutes (21). The samples were crushed and observed with an optical microscope at 40 and 100X. Three replicates were performed.

*Comet assay*

Ten mL of peripheral blood were collected from the volunteers. White blood cells were immediately isolated and exposed to n-butanol (0.01 and 0.001%), 0.5% tilapia collagen solution, PBS (negative control) or 12% hydrogen peroxide (positive controls). After 2 h of treatment, the white blood cells viability was determined by staining with 1.0 mM propidium iodide (Invitrogen, USA) and controlled with an Olympus BX51 40X fluorescence microscope using the 536 and 617 nm filters. The samples were placed on slides previously prepared with a layer of agarose and cell lysis was performed with the buffer containing NaCl 2.5M, Na<sub>2</sub>EDTA 100mM, Tris HCl 10mM, Triton X-100 1%, and DMSO 10%. The samples were then incubated at 4.0 °C for 4 h, followed by electrophoresis at 25V (Power Pack P25 Timer, Biometra GmbH, Germany) and 300mA for 30 minutes in buffer pH 13 (1.0mM Na<sub>2</sub>EDTA and 300mM NaOH). The samples were

*Obtenção de colágeno de tilápia (O. niloticus)*

O colágeno foi obtido pelo método de extração de colágeno solúvel em ácido acético (ASC), segundo relatório recente (9). Após sucessivas lavagens com água destilada em abundância, a pele de tilápia foi pré-tratada com 0,1M NaOH (1:20 p/v) por 24 h, seguido de tratamento com n-butanol a 10% (1:20 p/v). Foram realizadas dez lavagens com água em abundância, em seguida, a extração foi realizada em ácido acético 0,5M por 48 h. Todo o procedimento foi realizado a 4,0 °C, filtrado com papel filtro (Whatman N° 4) e depois liofilizado.

*Teste de allium*

Os bulbos de cebola estavam imersos em água, de forma que o disco germinal estivesse totalmente imerso. Quando as raízes atingiram entre 1 e 2 cm de comprimento, o teste foi iniciado. Foram realizados sucessivos testes de n-butanol para determinar a viabilidade e atividade das células. As concentrações utilizadas foram de 10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 e 0,025%. Em seguida, as raízes em crescimento foram expostas às seguintes soluções: n-butanol, água residual da última lavagem do pré-tratamento do processo de extração de colágeno (décima lavagem), colágeno a 0,5% em água destilada e água purificada, como controle. Após 6h de tratamento, os meristemas apicais foram cortados das raízes, fixados em etanol: solução de ácido acético (3: 1 v/v) e mantidos a -4,0 °C por pelo menos 24 h. As amostras foram coradas com 1,0% de orceina acética 1N: HCl (9: 1 v/v) por 30 minutos (21). As amostras foram observadas em um microscópio óptico a 40 e 100X. Foram realizadas três réplicas.

*Ensaio do cometa*

Foram coletados 10 mL de sangue periférico dos participantes e os glóbulos brancos foram imediatamente isolados e expostos a n-butanol 0,01 e 0,001%; solução de colágeno de tilápia a 0,5%; e controles negativo (PBS) e positivo (12% peróxido de hidrogênio). Após 2h de tratamento, a viabilidade dos glóbulos brancos foi determinada pela coloração com iodeto de propídio de 1,0mM (Invitrogen, EUA) e controlada com um microscópio de fluorescência Olympus BX51 40X, usando filtros de 536 e 617 nm. As amostras foram colocadas em cubas previamente preparadas com primeira camada de agarose e a lise celular foi realizada com o tampão contendo NaCl 2,5M, Na<sub>2</sub>EDTA 100mM, Tris HCl 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%. Depois, foram incubadas a 4,0 °C por 4 h e seguidas por eletroforese a 25V (Power

neutralized in Tris HCl solution pH 7.5 for 3 minutes and fixed in 96° alcohol for 3 minutes (22). Samples were stained with SYBR Gold and observed under a fluorescence microscope with 40X magnification (23).

#### *Data collection*

The frequency of the cell cycle phases was recorded and typified in the different treatments and in the treatments that registered genetic changes in the *Allium* test. The DNA damage was quantified using the Score Assay program and the percentage of DNA in the tail (% Tail DNA) was considered a genotoxicity parameter in the comet assay (24).

#### *Statistical Analysis*

The averages of each variable were compared by analysis of variance with the Origin Pro 2020 program (OriginLab Corporation, USA) and regression analysis was applied to reveal the dose-response relationship of chemical compounds, with a reliability level of  $\alpha = 0.05$ .

## **Results and Discussion**

Collagen extraction methods are well described in the literature. In general, three steps are commonly used to extract low molecular weight collagen hydrolysates from natural resources: initial treatment of the raw material, gelatin (collagen) extraction, and collagen hydrolysis. In the pretreatment (initial treatment) phase, sodium hydroxide is used to eliminate non-collagen proteins and butyl alcohol used to reduce lipids. The last step could be divided into enzymatic, chemical, and subcritical water hydrolysis (3).

Dynamics of cell proliferation in the apical meristem of *Allium cepa*, achieved between 1 to 3 days of growth induction is a sensitive biological scenario to detect substances that can affect the genetic material (25). Thus, *Allium* test is comparable to assays on animals and cell line cultures (26). As shown in Figure 1A, we observed transparent aspect and withered roots, unlike the roots shown in Figures B and C, which corresponded to the treatments with the collagen suspension (0.5%) and control growth in distilled water, respectively. Degradation of the nucleus and cytoplasm were observed in the samples exposed to 10.0% n-butanol for 6 h (Figure 1D), thus this concentration can be considered lethal. Moreover, high inhibition of cell activity was observed at 1.0% n-butanol, mitotic index

Pack P25 Timer, Biometra GmbH, Alemanha) e 300mA por 30 minutos em pH tampão 13 (1,0mM Na<sub>2</sub>EDTA e 300mM NaOH). Foi realizada a neutralização na solução Tris HCl pH 7,5 por 3 minutos e fixação em 96° álcool por 3 minutos (22). Amostras coradas com SYBR Gold foram observadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 40X (23).

#### *Coleta de dados*

A frequência das fases do ciclo celular foi registrada e tipificada nos diferentes tratamentos e nos tratamentos que registraram alterações genéticas no ensaio de *Allium*. O dano de DNA foi quantificado usando o programa Score Assay e a porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda) foi considerado um parâmetro de genotoxicidade no ensaio do cometa (24).

#### *Análise estatística*

As médias de cada variável foram comparadas pela análise de variância com o programa Origin Pro 2020 (OriginLab Corporation, EUA) e a análise de regressão foi aplicada para revelar a relação dose-respostas compostos químicos, com nível de confiabilidade de  $\alpha = 0,05$ .

## **Resultados e Discussão**

Os métodos de extração de colágeno são bem descritos na literatura. Em geral, três etapas são comumente usadas para extrair hidrolisados de colágeno de baixo peso molecular de recursos naturais: tratamento inicial da matéria-prima, extração de gelatina (colágeno) e hidrólise de colágeno. Na fase de pré-tratamento (tratamento inicial), hidróxido de sódio é usado para eliminar as proteínas não colágenas e o álcool butílico para reduzir os lipídios. A última etapa pode ser dividida em hidrólise enzimática, química e subcrítica (3).

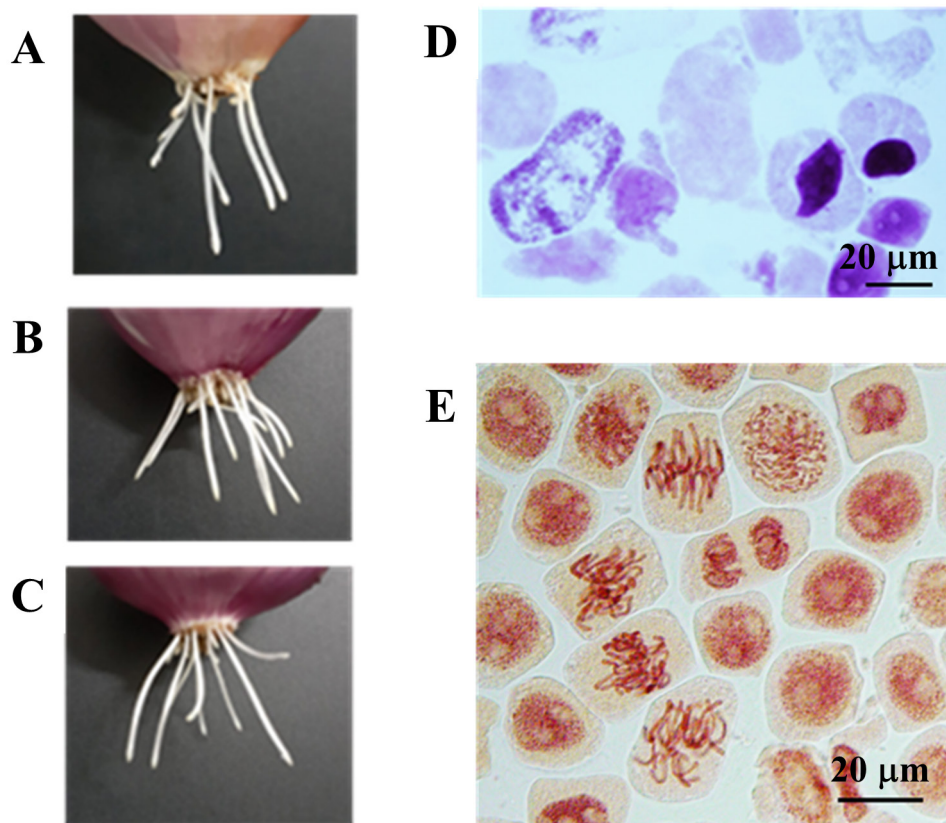
A dinâmica de proliferação celular no meristema apical de *Allium cepa*, alcançada entre 1 a 3 dias de indução de crescimento, é um cenário biológico sensível para detectar substâncias que podem afetar o material genético (25). Assim, o teste de *Allium* é comparável aos ensaios com animais e culturas de linhagens celulares (26). Na Figura 1A observa-se aspecto transparente e raízes muradas, ao contrário das raízes ilustradas nas Figuras B e C, que corresponderam aos tratamentos com amostras da suspensão do colágeno (0,5%) e o controle, cultivadas em água destilada, respectivamente. A degradação do núcleo e do citoplasma (Figura 1D) das

of 2.99% with absence of normal cells in the metaphase; and the mitotic index of 2.75% (not significant) was found at 0.5% n-butanol with the presence of mitotic phases. In addition, there were four metaphases, two prophase and one telophase in an unusual single visual field at the concentration of 0.025% n-butanol (Figure 1E).

The percentage of cell divisions in root meristems of *A. cepa* was determined by the mitotic index. Lethality and no cell activity were observed with 10.0% n-butanol, while for 1.0, 0.5 and 0.1% n-butanol, a significant decrease in cell activity was observed compared to those treated with lower concentrations (0.05 and 0.025%). These last indices were compared with those of the negative control, collagen solution at 0.5% and the residual water of the final (tenth) rinse of the pretreatment process (Figure 2).

amostras expostas ao n-butanol a 10.0% por 6 h, sendo aquelas concentrações consideradas letais. Além disso, observou-se alta inibição da atividade celular para 1,0% n-butanol, índice mitótico de 2,99% com ausência de células normais na metafase; e o índice mitótico de 2,75% (não significativo) foi encontrado para 0,5% n-butanol com a presença de fases mitóticas. Ainda, havia quatro metafases, duas pró-fases e uma telofase em um campo visual único incomum na concentração de 0,025% (Figura 1E).

A porcentagem de divisões celulares em meristemas radiculares de *A. cepa* foi determinada pelo índice mitótico. Para 10,0% do n-butanol foram observadas letalidade e ausência de atividade celular, enquanto para 1,0; 0,5; e 0,1% observou-se diminuição significativa na atividade celular em comparação com as de 0,05 e 0,025%. Estes últimos índices foram comparáveis



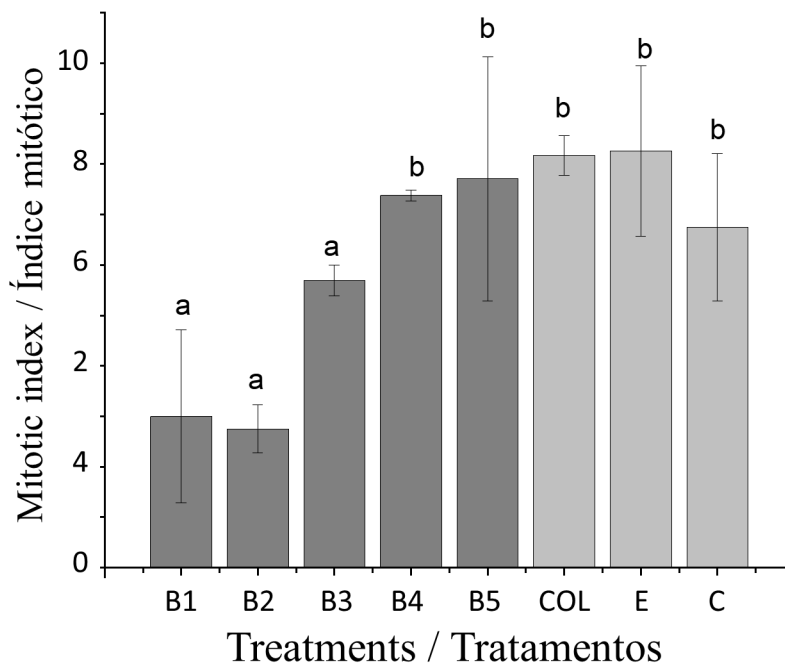
**Figure 1** - *Allium cepa* apical meristems exposed to chemicals. **A**, 10% n-Butanol; **B**, collagen suspension (0.5%); **C**, control (distilled water); **D**, Cellular degradation of atypical *Allium cepa* root samples exposed to 10.0% n-butanol; **E**, Cells in active mitosis, metaphase increased using 0.025% n-butanol (Olympus BX51 microscope, Japan, 100X). Bar 20 µm.

**Figura 1** - Meristemas apicais de *Allium cepa* expostos a produtos químicos. **A**, n-Butanol, 10,0%; **B**, suspensão de colágeno (0,5%); **C**, controle (água destilada); **D**. Degradação celular de amostras de raiz apical *allium cepa* expostas a n-butanol 10,0%; **E**. Células em mitose ativa, a metafase aumentou usando 0,025% n-butanol (microscópio Olympus BX51, Japão, 100X). Barra 20 µm.

We observed the following cellular level changes produced by n-butanol in *A. cepa* at the metaphase level: partial cytostatic effect at concentrations of 0.5 and 1.0%. Figure 3A shows normal metaphase and figure 3B shows stopped metaphase (c-metaphase), in which the chromosomes were dispersed and highly condensed. This irregular variation was an indicative of the absence or failure of the achromatic spindle formation, as well as signs of chromosomal compaction due to metaphasic stagnation (27). Variants of the normal phases of anaphase and bipolar telophase (Figures 3C and E, respectively) in comparison with the presence of lag chromosomes in anaphase (Figure 3D) and multipolar structure in telophase (Figure 3F), are evidence to contribute to the dysfunction of the achromatic spindle and defective centrosome division, as illustrated in Figure 3F, with four polar centers rather than two. The assembly of the mitotic spindle organized in a bipolar way, with dynamic balance of kinesin-5 and dynein, ensures equitable distribution of chromosomes during segregation in mitosis (28).

aos do controle negativo, da solução de colágeno em 0,5% e da água residual da lavagem final (a décima) do processo de pré-tratamento (Figura 2).

Observamos as seguintes alterações de nível celular produzidas por n-butanol em *A. cepa* no nível de metáfase: efeito citostático parcial em concentrações de 0,5 e 1,0%. A Figura 3A ilustra metáfase normal e, a Figura 3B, a metáfase parada (c-metáfase), na qual os cromossomos estão dispersos e altamente condensados. Essa variação irregular foi um indicativo da ausência ou falha da formação do eixo acromático, bem como sinais de compactação cromossômica devido à estagnação metafásica (27). A presença de cromossomos lag em anáfase (Figura 3D) e estrutura multipolar em telófase (Figura 3F), variantes das fases normais de anáfase e telófase bipolar (Figuras 3C e E, respectivamente) são provas que contribuem para a disfunção do fuso acromático e da divisão centrossômica defeituosa, como é ilustrado na Figura 3F com quatro centros polares em vez de dois. A montagem do fuso mitótico



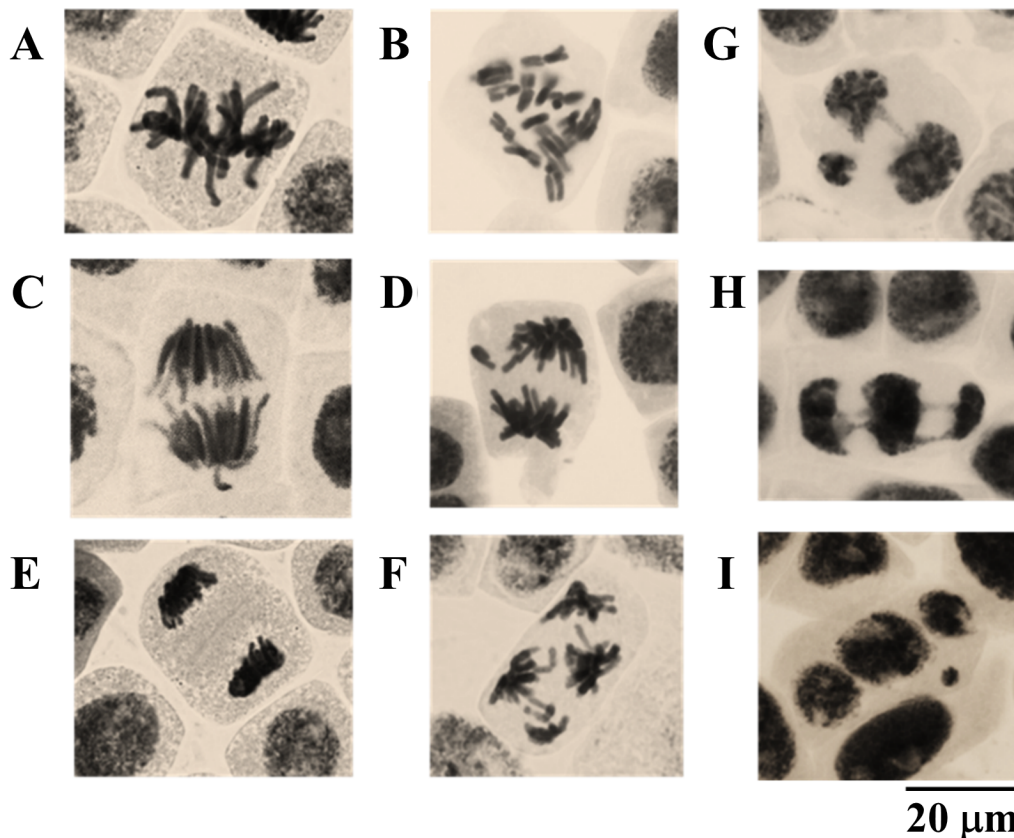
**Figure 2** - Mitotic index of *Allium cepa* apical meristem exposed to different treatments. B1, 1% n-Butanol; B2, 0.5% n-Butanol; B3, 0.1% n-Butanol; B4, 0.05% n-Butanol; B5, 0.025% n-Butanol; COL, 0.5% collagen solution; E, Final rinse from collagen extraction pre-treatment; C, Negative control (distilled water). Bar represents SD of  $n \geq 3$ . Different letters represent significant differences ( $p < 0.05$ )

**Figura 2.** - Índice mitótico de meristema apical de *Allium cepa* exposto a diferentes tratamentos. B1, 1,0% n-Butanol; B2, 0,5% n-Butanol; B3, 0,1% n-Butanol; B4, 0,05% n-Butanol; B5, 0,025% n-Butanol; COL. Colágeno 0,5%; E. Última lavagem do pré-tratamento na extração de colágeno; C. Controle negativo (água destilada). Barras representam DP de  $n \geq 3$ . Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Furthermore, the dysfunctional organization in supernumerary centrosomes leads to flaws in cytokinesis and numerical variations of chromosomes in the resulting cells (29). Figure 3G-I shows another alteration produced by n-butanol was the breakdown of chromosomes. Figure 3G illustrates a telophase cell with a chromosome bridge; moreover, not clearly defined whether they were delayed or tripolar chromosomes. In the absence of cytokinesis, a tripolar cell with chromosome bridges between chromosome groups would increase to a cell with three nuclei, as in Figure 3H,I. Likewise, the presence of micronuclei (Figure 3I) indicated chromosomal breaks produced in phases prior to mitosis.

organizado de forma bipolar, com equilíbrio dinâmico de cinesina-5 e dineína, garante a distribuição equitativa de cromossomos durante a segregação em mitose (28).

Ademais, a organização disfuncional em centrosomas supranumerários leva a falhas na citocinese e variações numéricas de cromossomos nas células resultantes (29). A Figura 3G-I ilustra que outra alteração produzida pelo n-butanol foi a quebra de cromossomos. A Figura 3G ilustra uma célula em telófase com uma ponte cromossômica; ademais, não está claramente definido se eles estavam atrasados ou se são cromossomos tripolares. Na ausência de citocinese, uma célula tripolar com pontes cromossômicas entre grupos cromossômicos aumentaria para uma célula com três



**Figure 3** - Changes in the mitosis process of *Allium cepa* apical meristem cells exposed to n-butanol. **A**, normal metaphase; **B**, stopped metaphase; **C**, normal anaphase; **D**, anaphase with a delayed chromosome; **E**, normal telophase; **F**, multipolar telophase; **G**, cell with chromosomal bridge and undefined or delayed multipolar chromosomes; **H**, cell in tripolar telophase and chromosomal bridges to each other; **I**, multinucleated cell and cell at the micronucleus interphase. Bar: 20  $\mu\text{m}$  (Olympus BX51 microscope, Japan, 100X).

**Figura 3.** - Mudanças no processo de mitose de meristema apical de *Allium cepa* expostas ao n-butanol. **A**, metafase normal; **B**, parou a metafase; **C**, anáfase normal; **D**, anáfase com um cromossomo atrasado; **E**, telófase normal; **F**, telófase multipolar; **G**, célula com ponte cromossômica e cromossomos multipolares indefinidos ou atrasados; **H**, célula em telófase tripolar e pontes cromossômicas umas para as outras; **I**, célula multinucleada e célula na interfase do micronúcleo. Barra: 20  $\mu\text{m}$  (microscópio Olympus BX51, Japão, 100X).

**Table 1** - Frequency of chromosomal aberrations in *Allium cepa* meristems under the effect of n-butanol, residual rinse water and collagen solution (SD of n=3, each replica greater than 2000 cells).

**Tabela 1** - Frequência de mutações cromossômicas em meristema de *Allium cepa* sob o efeito de n-butanol, água de lavagem residual e solução de colágeno (DP de n=3, cada réplica maior que 2000 células).

Treatment / Tratamento	Micronuclei / Micronúcleos	Altered metaphase / Metáfase alterada	C-metaphase / C-metáfase	Multipolar / Multipolar	Chromosomal bridge / Ponte cromossômica
n-Butanol 1.0%	0.38 ± 0.26	0.28 ± 0.25	0.48 ± 0.17	0.39 ± 0.14	0.01 ± 0.02
n-Butanol 0.5%	0.21 ± 0.16	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.09 ± 0.11	0.02 ± 0.03
n-Butanol 0.1%	0	0	0	0	0.03 ± 0.03
Residual water pre-extraction / Pré-extração de água residual	0	0	0	0	0
Collagen / Colágeno 0.5%	0	0	0	0	0
Control (distilled water) / Controle (água destilada)	0	0	0	0	0

The alterations recorded after 6 h of exposure were registered at the final stage of replication process (S phase) and G2 phase (premitotic), as well as the presence of multipolar-centers. They can occur as a consequence of the cellular and chromosomal cytoskeleton instability due to the effect of n-butanol, which would have produced fragmentation of the pre-existing centrosome(s) instead of a centrosome amplification. The formation of multipolar spindle regardless of the amplification of the centrosome in HeLa cells after irradiation in G2 phase has been previously observed (30). Moreover, it is known that the centrosome duplication has occurred only once in each cell cycle and began in the G1 (pre-replication)/S phase and completed during G2 phase (31). However, future investigations with a centrosomal labeling should be carried out to determine if it is a fragmentation or amplification.

The quantified changes due to the effect of n-butanol are summarized in Table 1. Multipolar cells were most frequently observed, followed by metaphases with dispersed and condensed chromosomes. Chromosomal changes were not observed in the other treatments, thus verifying the genotoxicity of n-butanol.

The comet assay is one of the methods used to measure DNA damage, using whole blood (22) or white blood cells isolated directly from peripheral blood (5). Among the parameters of genotoxicity, the percentage of DNA in the comet test is used as the most informative parameter due to its relationship with the magnitude of the DNA damage. The greater the DNA breakage, the greater the tail length due to migration, therefore, the visualization will be immediate and the intensity of the tail more evident (32). DNA damage was quantified using the DNA percentage parameter on the tail.

núcleos, na Figura 3H,I. Da mesma forma, a presença de micronúcleos (Figura 3I) foi uma evidência de quebras cromossômicas produzidas em fases anteriores à mitose.

As alterações, após 6h de exposição, foram registradas na fase final do processo de replicação (fase S) e G2 (pré-mitótica), bem como a presença de centros multipolares, nas Figuras 2F e 4A. Eles podem ocorrer como consequência da instabilidade celular e do citoesqueleto cromossômico devido ao efeito do n-butanol, que teria produzido fragmentação do(s) centrôssomo(s) pré-existente(s) em vez de uma amplificação do centrôssomo. Já foi observada a formação de fuso multipolar independentemente da amplificação do centrôssomo em células HeLa após irradiação na fase G2 (30). Ademais, sabe-se que a duplicação do centrôssomo ocorreu apenas uma vez em cada ciclo celular e teve início na fase G1 (pré-replicação)/fase S e concluída durante a fase G2 (31). No entanto, futuras investigações com rotulagem centrôssomal devem ser realizadas para esclarecer se é uma fragmentação ou amplificação.

A Tabela 1 apresenta alterações quantificadas pelo efeito de n-butanol, com as mais frequentes células multipolares, seguidas por metafases com cromossomos dispersos e condensados. Alterações cromossômicas não foram registradas nos outros tratamentos, verificando assim a genotoxicidade do n-butanol.

O ensaio do cometa é um dos métodos utilizados para medir danos ao DNA, utilizando sangue inteiro (22) ou glóbulos brancos isolados diretamente do sangue periférico (5). Entre os parâmetros de genotoxicidade, a porcentagem de DNA no teste do cometa é usada como parâmetro mais informativo devido à sua relação com a magnitude do dano de DNA. Quanto mais o DNA quebrar, maior o comprimento da cauda devido

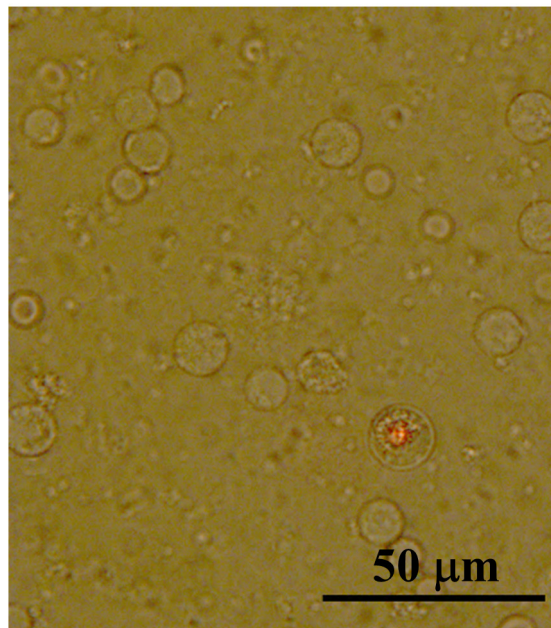
In our investigation, the toxicity of n-butanol was determined by the percentage of living cells with the differential staining given by propidium iodide in white blood cells isolated from human peripheral blood. Only dead cells were colored, as seen in Figure 4. Concentrations above 0.1% n-butanol were lethal in the white blood cells. The percentage of viability of white blood cells exposed to 0.001% n-butanol was 96.87%. Cellular viability greater than 75% has been reported to be necessary for the validity of genotoxicity tests (33).

DNA damage of white blood cells due to the exposure to n-butanol was demonstrated by the degree of DNA migration in alkaline unicellular electrophoresis (pH> 13). The heterogeneity of the response of white blood cells to a clastogenic compound was observed at the same sub-lethal dose and exposure time recorded in all investigations (34). Figure 5 shows the variable magnitude of DNA damage in white blood cells, from zero level (no damage) in A, mild damage levels in B and C, medium damage in D and high damage in E and F. These types of damage were recorded in all treatments including the positive and negative controls, using the % Tail DNA to determine the clastogenic activity.

à migração, portanto, a visualização será imediata e a intensidade da cauda mais evidente (32). Os dados de dano ao DNA foram quantificados usando o parâmetro percentual de DNA na cauda.

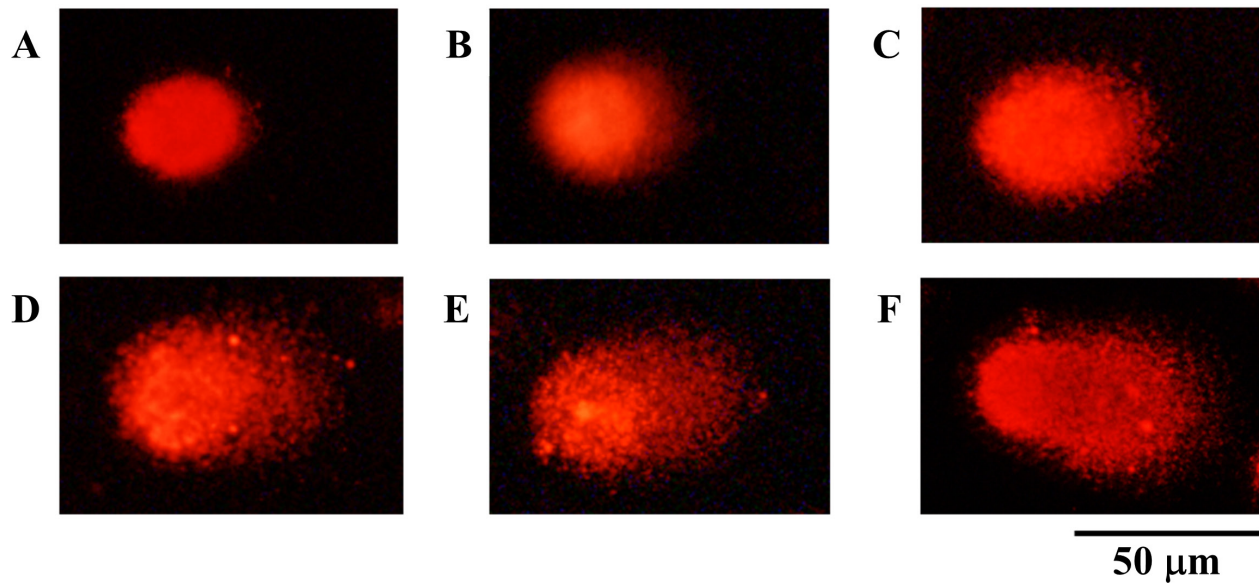
Em nossa investigação, a toxicidade do n-butanol foi determinada pela porcentagem de células vivas com a coloração diferencial dada pelo iodeto de propídio em glóbulos brancos isolados do sangue periférico humano. Apenas células mortas eram coloridas, como na Figura 4. Concentrações acima de 0,1% de n-butanol foram letais aos glóbulos brancos. O percentual de viabilidade dos glóbulos brancos expostos a 0,001% n-butanol foi de 96,87%. Foi relatado que é necessário que a viabilidade das células seja superior a 75% para a validade dos testes de genotoxicidade (33).

O dano de DNA dos glóbulos brancos foi evidenciado pelo grau de migração de DNA na eletroforese unicelular alcalina (pH> 13) quando exposto ao n-butanol. A heterogeneidade da resposta dos glóbulos brancos a um composto clastogênico foi evidenciada na mesma dose sub-letal e tempo de exposição registrado em todas as investigações (34). A Figura 5 ilustra a magnitude variável dos danos do DNA em glóbulos brancos, a partir do nível zero (sem dano) em A, níveis de dano



**Figure 4** - Cell viability of human peripheral blood white blood cells. Non-colored cells with 1.0mM propidium iodide correspond to living cells. Bar: 50μm (Olympus BX51 fluorescence microscope, Japan, 100X).

**Figura 4** - Viabilidade celular de glóbulos brancos do sangue periféricos humanos. Células não coloridas com iodeto de propídio de 1,0mM correspondem a células vivas. Barra: 50μm (Olympus BX51 microscópio de fluorescência, Japão, 100X).



**Figure 5** - DNA fragmentation in alkaline comet assay of white blood cells. **A**, Cell with normal DNA; **B** and **C**, Cell with low DNA damage; **D**, Cell with intermediate DNA damage; **E** and **F**, Cell with high DNA damage. Bar: 50  $\mu\text{m}$ . Olympus BX51 fluorescence microscope, Japan, filter 546 nm and barrier filter 590 nm at 400x).

**Figura 5** - Fragmentação de DNA no ensaio de cometa alcalino de glóbulos brancos. **A**. Célula com DNA normal; **B** e **C**. Célula com baixo dano de DNA; **D**. Célula com dano de DNA intermediário; **E** e **F**. Célula com alto dano de DNA. Bar: 50  $\mu\text{m}$ . Microscópio de fluorescência Olympus BX51, Japão, filtro de 546 nm e filtro de barreira de 590 nm a 400x).

Figure 6A. shows the comparison of averages of the DNA percentage in the comet tail for the treatment with n-butanol (0.5%), without differences with the positive control and significantly different to the negative control, as well as the collagen extract (0.5%). The percentage of viability evaluated after the n-butanol treatment remained above 95% with an average between treatments of  $97.20 \pm 0.12\%$ . Concentrations lower than 0.1% n-butanol showed a decrease in the clastogenic effect without significant variations with concentration (Figure 6B). The high variability in the damage degree of the white blood cells exposed to n-butanol within each treatment reflects the variation in the sensitivity of cellular response.

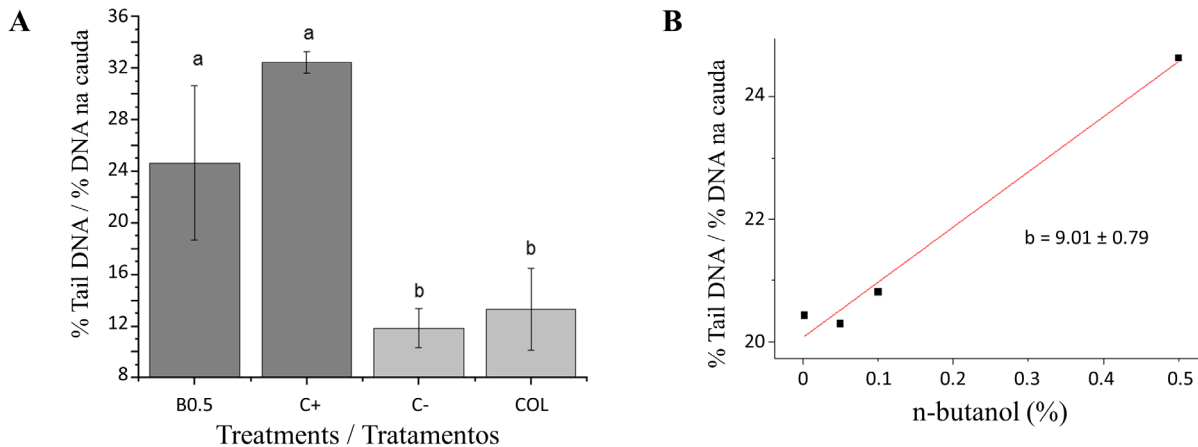
In the cytological tests of *A. cepa* with the rinsing liquid and with 0.5% collagen, the mitotic cycle was normal with no evidence of chromosomal damage. If the rinses were insufficient, chemical residues could remain in the collagen. Fortunately, due to the low-fat content in tilapia skin (3.85%) (35), compared to other species of fish, such as *Sardinella maderensis*, (26.0%) and *S. aurita*, (24.0%) (36), n-butanol could be replaced by ethyl alcohol to remove fat (37). Another alternative treatment to eliminate fat from the raw material is

leve em **B** e **C**, dano médio em **D** e dano elevado em **E** e **F**. Esses tipos de danos foram registrados em todos os tratamentos, incluindo os controles positivo e negativo, sendo a % de causa de DNA o parâmetro que usamos para determinar a atividade clastogênica.

A Figura 6A ilustra a comparação das médias do percentual de DNA na cauda do cometa para o tratamento com n-butanol (0,5%), sem diferenças com o controle positivo e significativamente diferente do controle negativo, bem como o extrato de colágeno (0,5%). O percentual de viabilidade avaliado após o tratamento com n-butanol permaneceu acima de 95% com média entre os tratamentos de  $97,20 \pm 0,12\%$ . Concentrações inferiores a 0,1% do n-butanol apresentaram diminuição do efeito clastogênico, sem variações significativas entre elas (Figura 6B). A alta variabilidade no grau de dano dos glóbulos brancos expostos ao n-butanol dentro de cada tratamento refletiu a variação na sensibilidade da resposta celular.

Nos testes citológicos de *A. cepa* com o líquido de lavagem e com colágeno a 0,5%, o ciclo mitótico foi normal, sem evidência de dano cromossômico. Se os enxágues não fossem suficientes, os resíduos químicos





**Figure 6 - A.** Percentage Tail DNA in human peripheral blood white cells exposed to treatments. C-. negative control, C+. positive control (hydrogen peroxide), COL. 0.5% collagen solution, B0.5. 0.5% n-butanol. Analysis of variance and Tukey statistic, different letters are significant different ( $p < 0.05$ ). **B.** % Tail DNA in function of the concentration variation of n-butanol ( $p < 0.05$ ). Bar represents SD of  $n=3$ .

**Figura 6 - A.** Percentual de cauda de DNA em glóbulos sanguíneos periféricos humanos expostos a tratamentos. C-. controle negativo, C+. controle positivo (peróxido de hidrogênio), solução de colágeno de 0,5%, B0,5. 0,5% n-butanol. Análise de variância e estatística de Tukey, letras diferentes são significativas diferentes ( $p < 0,05$ ). **B.** % de DNA na cauda em função da variação de concentração de n-butanol ( $p < 0,05$ ). A barra representa DP de  $n=3$ .

fermentation with *Bacillus velezensis*, which has a high capacity to metabolize fat and proteins (38).

It has been shown that 1-butanol or n-butanol is absorbed through the skin and respiratory tract and produces pathological changes in the liver and kidneys in rats, but not a mutagenic or carcinogenic effect (39). Likewise, investigations in pregnant rats exposed to 1.0% n-butanol administered through water reported toxicity and a decrease in maternal and fetal body weight (40). For the Ames test, non-mutagenicity was reported for n-butanol (16). In contrast, zebrafish embryos exposed to n-butanol exhibited severe oxidative damage with consequent damages in liver and brain tissues, according to a recent study (41). However, our study revealed the possibility of genetic changes if n-butanol is continuously used for long periods of time.

In summary, we revealed the DNA fragmentation of interphase, specialized and viable cells exposed *in vitro* to n-butanol with the comet assay. Moreover, alterations in addition to DNA breaks were detected with the *Allium* test. However, further study is required to provide information about the mechanisms of action of the n-butanol DNA damage.

poderiam permanecer no colágeno. Devido ao baixo teor de gordura na pele da tilápia (3,85%) (35), em comparação com outras espécies de peixes, como *Sardinella maderensis* (26,0%) e *S. aurita* (24,0%) (36), o n-butanol poderia ser substituído por álcool etílico para remover a gordura (37). Outro tratamento alternativo para eliminar a gordura da matéria-prima é a fermentação com *Bacillus velezensis*, que tem alta capacidade de metabolizar gordura e proteínas (38).

Foi demonstrado que 1-butanol ou n-butanol é absorvido pela pele e trato respiratório e produz alterações patológicas no fígado e rins em ratos, mas não um efeito mutagênico ou cancerígeno (39). Da mesma forma, investigações em ratas gestantes expostas a 1,0% de n-butanol administrado através da água relataram toxicidade e diminuição do peso corporal materno e fetal (40). Para o teste de Ames, foi relatado efeito não mutagênico para o n-butanol (16). Em contraste, os embriões de peixes-zebra expostos ao n-butanol apresentaram danos oxidativos graves com consequentes danos nos tecidos hepáticos e cerebrais, de acordo com um estudo recente (41). No entanto, nosso estudo revelou a possibilidade da ocorrência em alterações genéticas se o n-butanol for continuamente utilizado por longos períodos de tempo.

## Conclusions

In the safety assessment of collagen extract obtained from the tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin for cosmetic use, we concluded that n-butanol was a genotoxic compound used, with significant changes in the mitotic apparatus and chromosomes of *Allium cepa* as well as a high percentage of DNA in the tail of the comets. In addition, we revealed clear evidence to consider partial (n-butanol) replacement or the verification of its complete elimination with successive (water) washes to minimize its presence in the raw material for further preparations containing natural products, such as this collagen derived from sustainable sources. We note the importance of providing multiple proofs of the genotoxic activity of the chemicals used in the collagen extraction process to ensure the absence of potentially harmful contaminants in the materials to be used within cosmetic formulations.

Em resumo, revelamos a fragmentação de DNA de células em interfases, especializadas e viáveis expostas *in vitro* ao n-butanol com o ensaio do cometa. Outras alterações são evidenciadas, além de quebras de DNA com o teste de *Allium*. No entanto, mais evidências são necessárias para fornecer informações sobre os mecanismos de ação de danos de DNA do n-butanol.

## Conclusões

Na avaliação de segurança do extrato de colágeno obtido da pele da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para uso dermocosmético, concluímos que o n-butanol foi um composto genotóxico utilizado no processo, com alterações significativas no aparelho mitotístico e cromossomos de *Allium cepa*, bem como alta porcentagem de DNA na cauda dos cometas. Ademais, revelamos uma evidência clara para considerar a substituição parcial (do n-butanol) ou verificação de sua eliminação total por lavagens sucessivas para minimizar sua existência remanescente na matéria-prima para preparos adicionais contendo produtos naturais, como o colágeno derivado de fontes sustentáveis. Observamos a importância de fornecer evidências da atividade genotóxica dos produtos químicos utilizados no processo de extração de colágeno para garantir a ausência de possíveis contaminantes químicos nos materiais utilizados para outras formulações dermocosméticas.

## Authors Contributions Statement

Conceptualization, Z.A.P., C.A.-J.; methodology, L.S.-T., N.R.-P.; formal analysis, A.R.B., D.S., C.A.-J., R.F.; investigation, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B., A.L.M.-J., C.A.-J., D.S.; writing - original draft preparation, Z.A.P., A.L.M.-J., F.D.S., A.R.B.; writing—review and editing, A.R.B., R.M.M., A.L.M.-J.; supervision, Z.A.P., C.A.-J.; project administration, Z.A.P., C.A.-J.; funding acquisition, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

Authors are very thankful to CONCYTEC-FONDECYT, process E041-01 (Contract number 123-2018-FONDECYT-BM-IADT/AV), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Process 305250/2019-1, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) Finance Code 001 and Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD).

## Acknowledgments

The authors are very thankful to Mónica Arqueros, biologist, for her help with the Comet Test.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Ethical Statement

This research was developed under the Ethical Process N°: 001-2020/CEI-UNT (Universidad de Trujillo).

## Declaração sobre as contribuições do autor

Conceituação, Z.A.P., C.A.-J.; metodologia, L.S.-T., N.R.-P.; análise formal, A.R.B., D.S., C.A.-J., R.F.; investigação, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B., A.L.M.-J., C.A.-J., D.S.; redação - preparação original do rascunho, Z.A.P., A.L.M.-J., F.D.S., A.R.B.; redação e edição, A.R.B., R.M.M., A.L.M.-J.; supervisão, Z.A.P., C.A.-J.; administração de projetos, Z.A.P., C.A.-J.; aquisição de financiamento, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

## Financiamento

Os autores são muito gratos ao CONCYTEC-FONDECYT, processo E041-01 (Contrato n° 123-2018-FONDECYT-BM-IADT/AV), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo 305250/2019-1, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código Financeiro 001 e Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD).

## Reconhecimento

Os autores são muito gratos a Mónica Arqueros, bióloga, por sua ajuda com o Teste do Cometa.

## Conflitos de Interesse

Os autores não declaram conflito de interesses.

## Declaração Ética

Esta pesquisa foi desenvolvida no âmbito do Processo Ético N°: 001-2020/CEI-UNT (Universidad de Trujillo).

## References / Referências

1. Salvatore, L., Gallo, N., Natali, M. L., Campa, L., Lunetti, P., Madaghiele, M., Blasi, F. S., Corallo, A., Capobianco, L., & Sannino, A. (2020). Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 113, 110963. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110963>
2. Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., & Shim, M. S. (2017). Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review. *Marine drugs*, 15(5), 143. <https://doi.org/10.3390/md15050143>
3. Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., & Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food chemistry*, 301, 125222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
4. Halim, N.R., Yusof, H., & Sarbon, N.M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 24-33. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.007
5. Ge, B., Wang, H., Li, J., Liu, H., Yin, Y., Zhang, N., & Qin, S. (2020). Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Marine drugs*, 18(4), 178. <https://doi.org/10.3390/md18040178>
6. Mei, F., Liu, J., Wu, J., Duan, Z., Chen, M., Meng, K., Chen, S., Shen, X., Xia, G., & Zhao, M. (2020). Collagen Peptides Isolated from *Salmo salar* and *Tilapia nilotica* Skin Accelerate Wound Healing by Altering Cutaneous Microbiome Colonization via Upregulated NOD2 and BD14. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(6), 1621–1633. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08002>
7. Aguirre-Cruz, G., León-López, A., Cruz-Gómez, V., Jiménez-Alvarado, R., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 181. <https://doi.org/10.3390/antiox9020181>
8. Liao, W., Guanghua, X., Li, Y., Shen, X. R., & Li, C. (2018). Comparison of characteristics and fibril-forming ability of skin collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biological macromolecules*, 107(Pt A), 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.022>
9. Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
10. Yamamoto, K., Igawa, K., Sugimoto, K., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Ikeda, T., Yamada, S., & Hayashi, Y. (2014). Biological safety of fish (tilapia) collagen. *BioMed research international*, 2014, 630757. <https://doi.org/10.1155/2014/630757>
11. Pati, F., Datta, P., Adhikari, B., Dhara, S., Ghosh, K., & Das Mohapatra, P. K. (2012). Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100(4), 1068–1079. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33280>
12. Hong, H., Fan, H., Roy, B. C., & Wu, J. (2021). Amylase enhances production of low molecular weight collagen peptides from the skin of spent hen, bovine, porcine, and tilapia. *Food chemistry*, 352, 129355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129355>
13. Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biological macromolecules*, 99, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.057>
14. Liu, W., Zhang, Y., Cui, N., & Wang, T. (2019). Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from snakehead (*Channa argus*) skin: Effects of hydrogen peroxide pretreatments and pepsin hydrolysis strategies. *Process Biochemistry*, 76, 194-202. doi:10.1016/j.procbio.2018.10.017.
15. Benhusein, G. M., Mutch, E., Aburawi, S., & Williams, F. M. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *The Libyan journal of medicine*, 5, 10.3402/ljm.v5i0.4637. <https://doi.org/10.3402/ljm.v5i0.4637>
16. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. (1975). Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 5135-5139. <http://www.jstor.org/stable/65363>
17. Demir, Y., Uckaya, M., & Demir, N. (2019). Evaluation of the efficacy in cosmetic products safety: Comparison with biochemical substrates. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 104, 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.03.001>
18. Prantl, E. M., Kramer, M., Schmidt, C. K., Knauer, M., Gartiser, S., Shuliakevich, A., Milas, J., Glatt, H., Meinel, W., & Hollert, H. (2018). Comparison of in vitro test systems using bacterial and mammalian cells for genotoxicity assessment within the "health-related indication value (HRIV) concept. *Environmental science and pollution research international*, 25(5), 3996–4010. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8166-z>
19. Fiskesjö G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
20. Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S., & ComNet project (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 759, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.10.001>
21. Giménez-Abián, M.I., Torre, C., & López-Sáez, J.F. (1987). Growth and cell proliferation in Allium roots at different oxygen tensions. *Environmental and Experimental Botany*, 27, 233-237..
22. Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
23. Amésquita, L., Cruz-Briceño, M. N., & Prieto, Z. (2018). Daño en el ADN de linfocitos humanos por efecto de cloroquina [Damage to human lymphocyte DNA from chloroquine effect]. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 35(3), 471–475. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2018.353.3166>
24. Reisinger, K., Blatz, V., Brinkmann, J., Downs, T. R., Fischer, A., Henkler, F., Hoffmann, S., Krul, C., Liebsch, M., Luch, A., Pirow, R., Reus, A. A., Schulz, M., & Pfuhler, S. (2018). Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 827, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.01.003>

25. Calvo, A., Cruz, J.L., Gutiérrez, C., García-Herdugo, G., Giménez-martin, G., & López-Sáez, J.F. (1982). Analysis of cell cycle in root meristems. *Journal of Theoretical Biology*, *96*, 295-308. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90226-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90226-0).
26. Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C.S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M.C., Liu, D., Menicucci, F., Pesnya, D.S., Popescu, A., Romanovsky, A., Schiff, S., Ślusarczyk, J., Souza, C.P., Srivastava, A., Şuğan, A., & Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, *71*, 191 - 209. doi:10.1080/00087114.2018.1503496
27. Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., & Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell reports*, *23*(8), 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.082>.
28. Batty, P., & Gerlich, D. W. (2019). Mitotic Chromosome Mechanics: How Cells Segregate Their Genome. *Trends in cell biology*, *29*(9), 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.007>
29. Leone, M., & Engel, F. B. (2019). Pseudo-bipolar spindle formation and cell division in postnatal binucleated cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *134*, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.07.005>
30. Fletcher, L., & Muschel, R. J. (2006). The centrosome and the DNA damage induced checkpoint. *Cancer letters*, *243*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.01.006>
31. Tanaka K. (2014). Centrosome duplication: suspending a license by phosphorylating a template. *Current biology : CB*, *24*(14), R651–R653. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.008>.
32. Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., & Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, *23*(3), 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
33. Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., & Windebank, S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, *13*(1), 89–94. <https://doi.org/10.1093/mutage/13.1.89>
34. Olive, P. L., & Durand, R. E. (2005). Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, *66*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>
35. Alfaro, A.T., Fonseca, G., Balbinot, E., Machado, A.G., & Prentice, C. (2013). Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. *Food Science and Technology International*, *33*, 592-595. doi.org/10.1590/S0101-20612013005000069
36. Njinkoué, J. M., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E. M., & Samb, A. (2002). Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, *131*(3), 395–402. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00506-1](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00506-1)
37. Menezes, M., Ribeiro, H. L., Abreu, F., Feitosa, J., & Filho, M. (2020). Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, *189*, 110852. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110852>
38. Song, Z., Liu, H., Chen, L., Chen, L., Zhou, C., Hong, P., & Deng, C. (2021). Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pretreatment. *Food chemistry*, *340*, 128139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128139>
39. International Programme on Chemical Safety, United Nations Environment Programme, International Labour Organization & World Health Organization. (1987). Butanols - four isomers: 1-butanol, 2-butanol, tert-butanol, isobutanol. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37266>
40. Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A., & Kamata, E. (2005). Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *43*(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.003>
41. Köktürk, M., Alak, G., & Atamanalp, M. (2020). The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *227*, 108636. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108636>



# Fascination of Plants Day May 2021

Organizado por / organized by:



**Vem conhecer melhor os Medicamentos à base de plantas  
“Get to know herbal medicines better”**

***Dia Internacional do Fascínio das Plantas 2021***

***Livro de Resumos / Book of Abstracts***

18 Maio, 2021 / May 18<sup>th</sup> 2021

ULHT + virtual, Lisboa, Portugal





## CBIOS

### Research Center For Biosciences & Health Technologies Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

O CBIOS foi criado em 2011 como uma estrutura da COFAC / U.Lusófona, para promover a investigação em ciências da saúde como parte da Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da universidade.

Como parte da nossa visão, o CBIOS desenvolve Estratégias Integradas de Saúde destinadas a apoiar o progresso das sociedades lusófonas.

O CBIOS atualmente inclui 23 membros integrados, 19 alunos de doutorado, 16 colaboradores e uma ampla rede colaborativa, operando em cinco domínios de investigação - ***Bioativos naturais (Bio.Natural), Desenvolvimento de Sistemas de Veiculação, Farmacologia e Mecanismos Moleculares, Sistemas de Modelação (MoSys) e Nutrição e Promoção da Saúde.***

Por ser uma unidade universitária, o CBIOS está altamente comprometido com a Diversidade, Equidade e Inclusão. Também tem o privilégio de operar dentro de um ambiente multidisciplinar e de mente alargada, essencial para fomentar a inovação, promover um ensino avançado e atrair jovens investigadores dinâmicos de diferentes origens e culturas.

CBIOS was created in 2011 as a structure of COFAC / U. Lusófona, to promote research in health sciences as part of the university's School of Health Sciences and Technologies.

As part of our vision, CBIOS develops Integrated Health Strategies designed to support the progress of Lusophone societies.

CBIOS currently includes 23 integrated members, 19 Ph.D. students, 16 collaborators, and a wide collaborative network, operating in five research domains – **Natural Bioactives (Bio.Natural), Development of Delivery Systems, Pharmacology, and Molecular Mechanisms, Modeling Systems (MoSys), and Nutrition and Health Promotion.**

Being an university-based unit, CBIOS is highly committed to Diversity, Equity, and Inclusion. It is also privileged to operate within a broad-minded, multidisciplinary environment essential to foster innovation, promote advanced learning, and attract dynamic young researchers from different backgrounds and cultures.

<http://cbios.ulusofona.pt/>



# *Dia Internacional do Fascínio das Plantas*

## **Descrição / Description**

As plantas são importantes não só na promoção de um estilo de vida saudável através de nutrientes e condimentos, como na prevenção e tratamento de doenças, através dos seus constituintes químicos naturais com ação farmacológica. Em todos os casos, a saúde do consumidor só é protegida pela garantia da qualidade dos produtos e sua segurança por meio de uma relação dose-efeito padronizada, procurando-se entender cada vez mais o seu modo de ação. Neste evento, reuniremos diversos trabalhos que mostram a importância do uso tradicional como suporte para os medicamentos à base de plantas. Serão apresentadas as características gerais dos medicamentos à base de plantas atualmente validados pela Agência Europeia de Medicamentos, com destaque para os de uso tradicional autorizados em Portugal. Este evento com palestras, posters e demonstrações com visitas aos laboratórios do Bio.Natural do CBIOS tem o objetivo de dar a conhecer melhor o que são os medicamentos à base de plantas.

Plants are important not only in promoting a healthy lifestyle as nutrients and seasonings, but also in the prevention and treatment of diseases through their natural chemical constituents with pharmacological activity. In all cases, the consumer's health is only protected by a guaranteed quality of the products and their safety through a standard dose-effect relationship, seeking to continually better understand their mode of action. In this event, we bring together different works that show the importance of traditional use as a support for herbal medicines. Traditionally used and well-established drugs currently validated by the European Medicines Agency will be introduced, highlighting those authorized in Portugal. This event, with lectures, posters, and demonstrations with visits to Bio.Natural laboratories of CBIOS, aims to give attendees a better understanding of herbal medicines.

## **Organização/ Organization**

**Patrícia Rijo, CBIOS, ULHT (Local Organizer / Organizadora ULHT/CBIOS)**

**Maria do Céu Costa, CBIOS, ULHT**

**Andreia Rosatella, CBIOS, ULHT**

**Agradecimentos:** A comissão organizadora agradece a Instituto Lusófono de Investigação e Desenvolvimento (ILIND) pelo projeto COFAC/ILIND/CBIOS/1/2020 e Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020.

**Acknowledgments:** The organizing committee gratefully acknowledges Instituto Lusófono de Investigação e Desenvolvimento (ILIND) for the project COFAC/ILIND/CBIOS/1/2020 and Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the projects UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020.





## Vem conhecer melhor os Medicamentos à base de plantas “Get to know herbal medicines better”

<https://ects.ulusofona.pt/conferencias/dia-internacional-do-fascinio-das-plantas-18-de-maio-de-2021/>

**18 de Maio de 2021 – Sala I.1.2.**

**Presencial/Presential: I.1.2. (ULHT)**

**Virtual: Zoom**

### Programa / Program

14:00-14:15	Welcome reception
14:15-14:30	<b>Opening:</b> L. Monteiro Rodrigues - CBIOS Director and Patrícia Rijo – Local Organizer, CBIOS
<b>Session 1</b>   Presential Chair: Patrícia Rijo (CBIOS, Lisboa, Portugal) Virtual Chair: Andreia Rosatella (CBIOS, Lisboa, Portugal)	
14:30-15:00	Talk #1 Herbal Medicines - Traditional and Well-established use Maria do Céu Costa (SPFito, Lisboa, Portugal)
15:00-15:15	Talk #2 Medicinal cannabis in Europe – an overview João Anes (EXMceuticals Portugal)
15:15-15:45	<i>Coffee Break / Posters</i>
<b>Session 2</b>   Presential Chair: Patrícia Rijo (CBIOS, Lisboa, Portugal) Virtual Chair: Andreia Rosatella (CBIOS, Lisboa, Portugal)	
15:45-16:00	Talk #3 Hydroalcoholic extract of <i>Calendula officinalis</i> L. (Asteraceae) inflorescences promotes gastric ulcers healing in rats Sergio Faloni de Andrade (CBIOS, Lisboa, Portugal)
16:00-16:15	Talk #4 Which place for the biorefinery in the circular bioeconomy? Forest biomass as a source of bioactives but not for HMP – the case of <i>Cupressus lusitanica</i> Mill Paula Pereira, <u>Maria João Cebola</u> , Oriana Pestana, José Nogueira, Maria Graça Miguel, Susana Dandlen, Patricia Rijo, Maria do Céu Costa (CBIOS, Univ Algarve, FCUL Lisboa, Portugal)
16:15-16:30	Q & A - Highlights & Lessons Learned Maria do Céu Costa (CBIOS, Lisboa, Portugal)
16:30-16:45	Closing session



## Vem conhecer melhor os Medicamentos à base de plantas

“Get to know herbal medicines better”

<b>Oral Communications .....</b>	<b>6</b>
Talk #1 Herbal Medicines - Traditional and Well-established use.....	6
Talk #2 Medicinal cannabis in Europe – an overview.....	7
Talk #3 Hydroalcoholic extract of <i>Calendula officinalis</i> L. (Asteraceae) inflorescences promotes gastric ulcers healing in rats.....	8
Talk #4 Which place for the biorefinery in the circular bioeconomy? Forest biomass as a source of bioactives but not for HMP – the case of <i>Cupressus lusitanica</i> Mill.....	9
<b>Poster Communications.....</b>	<b>10</b>
PC #1 Naturally Occurring diterpenoids from <i>Plectranthus mutabilis</i> Codd. with cytotoxic Activity.....	10
PC #2 Natural diterpenoids from <i>Plectranthus</i> spp. as anti-apoptotic agents.....	11
PC #3 Synopsis of the Bioactivity of Abietane Diterpene isolated from <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth.....	12
PC #4 LOXL2 inhibitory activity of pimaranes from medicinal plants.....	13
PC #5 Antioxidant, antimicrobial activity and general toxicity of methanolic ultrasound-assisted <i>Plectranthus</i> spp. extracts and their potential use in dermocosmetics.....	14
PC #6 Mutagenic and antimutagenic activity of Myrtle extracts.....	15
PC #7 Initial studies on the phytochemical and antitumoral activity of <i>Plectranthus hadiensis</i> (Forssk.) Schweinf. ex Sprenger aerial parts.....	16
PC #8 Glycine-based IL to improve the performance of O/W emulsions containing rutin.....	17



## Oral Communications

### Talk #1 Herbal Medicines - Traditional and Well-established use

Maria do Céu Costa

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

SPFITO- Portuguese Society of Phytochemistry and Phytotherapy (member of ESCOP, <https://escop.com/>), Rua da Sociedade Farmacêutica, 18, 1169-075 Lisboa (<https://spfito.pt/>)

General concepts of regulation of herbal medicines of traditional use and of well-established use. ACM-Drug Marketing Authorization: case of Cannabis.

Since the Medicinal Plant is defined as any plant that in one, or more than one, of its organs, contains substances that can be used for therapeutic purposes or that are precursors for chemical-pharmaceutical hemi-synthesis, it is important to clarify the concepts of herbal substance and of herbal medicine. Herbal substances are any whole, fragmented or cut plants, unprocessed, dried or fresh plant parts, algae, fungi and lichens and some exudates not subject to specific treatment, defined through the part of the plant used and the botanical taxonomy, including the species, the variety, if any, and the author (Dec. Law 176/2006, paragraph 1 of art. 3). Herbal preparations, are preparations obtained by subjecting herbal substances to treatments such as extraction, distillation, expression, fractionation, purification, concentration or fermentation, such as substances derived from powdered or powdered plants, tinctures, extracts, essential oils, squeezed juices and processed exudates. In this presentation, an overview of herbal medicines in the EU and Portugal will be presented.



## Talk #2 Medicinal cannabis in Europe – an overview

João Anes<sup>1</sup> and Adília Charmier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> EXMceuticals Portugal, Lda, Edifício Tec Labs campus da FCUL, Campo Grande 1749-016, Lisboa Portugal.

<sup>2</sup> Faculdade de Engenharia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

Plants have been used for medicinal purposes long before prehistoric period. Among these ancient medicinal herbs, Cannabis, a flowering plant of the family *Cannabaceae*, originating from Central and South Asia, was used due to its broad-spectrum applications over the centuries. Its uses ranged from ropes, clothing, paper to its psychoactive properties, making it a very appealing plant. From the 1900's onwards cannabis consumption was deemed illegal in several countries around the world due to its overuse consequences [1].

The lack of scientific information regarding the mechanism of action of its constituents was a direct consequence from the illegal status given in the 1900's. Recently, this has changed, cannabis pre-clinical studies have shown several medicinal properties which helped cannabis gained traction and legal status for its medicinal use in most of North and South America, and in some European countries, lifting some of the old prejudice. In Europe, medicinal cannabis usage is still growing. Several cannabinoid-containing medicinal products are already available in the market [2,3].

EXMceuticals Portugal is one of the European Pharmaceutical companies working with medicinal cannabis that is specialized in extraction and purification of cannabinoids and terpenes for pharmaceutical grade ingredients. Most recently, due to the COVID-pandemic our research efforts have been put to “BioBlock COVID”, a project that focus on antiviral properties of terpenes from cannabis and other medicinal plants for inactivation of the virus SARS-CoV-2, and its applications in tissues, hand and surface disinfectants.

### References

[1] Zuardi A.W. (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28(2), 153-7.

[2] Freeman, T. P., Hindocha, C., Green, S. F., & Bloomfield, M. (2019). Medicinal use of cannabis based products and cannabinoids. *BMJ (Clinical research ed.)*, 365, 11141. <https://doi.org/10.1136/bmj.11141>

[3] Lipnik-Štangelj, M., & Razinger, B. (2020). A regulatory take on cannabis and cannabinoids for medicinal use in the European Union. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 71(1), 12–18. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3302>



## Talk #3 Hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) inflorescences promotes gastric ulcers healing in rats

Luisa Mota da Silva<sup>1</sup>, Ana Carolina de Araújo<sup>1</sup>, Viviane Silva Bunn<sup>1</sup>, Luisa Nathalia Bolda Mariano<sup>1</sup>, Lincon Bordignon Somensi<sup>1</sup>, Luiz Carlos Klein Jr.<sup>1</sup>, Sérgio Faloni de Andrade<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Centro, 88302-202 Itajaí, SC, Brazil.

<sup>2</sup>CBios - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

email: [sergio.andrade@ulusofona.pt](mailto:sergio.andrade@ulusofona.pt)

*Calendula officinalis* L. (Asteraceae), popularly known as Marigold in Europe and “Calêndula” in Brazil, is a medicinal plant widely distributed in the world. The plant is listed in German Commission E, European Scientific Cooperative on Phytotherapy, British Herbal Pharmacopeia, World Health Organization monographs and “Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Brazilian Pharmacopeia)” for wound healing and anti-inflammatory actions. Its inflorescences have been used for centuries to treat a wide variety of ailments including skin diseases, wounds, burn and gastrointestinal ulcers. Despite the folk use, there are no studies about the potential of *C. officinalis* extract to heal gastric ulcers. Therefore, this study aims to fill out this lack. The healing gastric ulcer potential of *C. officinalis* inflorescences extract was evaluated using chronic gastric ulcer induced by acetic acid in Wistar rats. Different groups (n=6) were treated orally with vehicle (water plus 0.5% Tween 80, 1mL/100 g), omeprazole (20 mg/kg), or *C. officinalis* inflorescences extract (10, 30 and 100 mg/kg), twice a day by seven days. The results showed that *C. officinalis* inflorescences extract is rich in phenolic substances and displays healing gastric chronic ulcer activity. The data suggest that effectiveness is related, at least part, to the capacity of extract to increase protective factors of gastric mucosa such as mucus and antioxidant factors as well as an increase in collagen synthesis. In addition, the findings of this study suggest that phytotherapeutic products can be obtained from *C. officinalis* inflorescences for the development of new drugs to treat gastric ulcers. It also contributed to the validation of the folk use of this species for the treatment of gastric ulcers.

### References

Chandra P, Kishore K, Ghosh A.K. (2015) Evaluation of antacid capacity and antiulcer activity of *Calendula officinalis* L. in experimental rats. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15, 277-285.

Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

Yadav AK, Mishra PK, Jain PK, Rao CV, Tiwaril S, Singh V. (2016) Investigation of *Calendula officinalis* whole plant as a gastroprotective and antioxidant in peptic ulcer. *British Journal of Medical and Health Research*. 3(7).

Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. (2001) Medicinal Flowers. III.1) Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane- Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49: 863-870.



## Talk #4 Which place for the biorefinery in the circular bioeconomy? Forest biomass as a source of bioactives but not for HMP – the case of *Cupressus lusitanica* Mill

Paula Pereira<sup>1,2</sup>, Maria João Cebola<sup>1,2,3</sup>, Oriana Pestana<sup>4</sup>, José Nogueira<sup>4</sup>, Maria Graça Miguel<sup>5</sup>,  
Susana Dandlen<sup>6</sup>, Patricia Rijo<sup>1</sup>, Maria do Céu Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>CERENA – Instituto Superior Técnico (IST Center for Natural Resources and Environment), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Escola Náutica Infante D. Henrique, Av. Eng. Boneville Franco, 2770-058 Paço de Arcos, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande Ed. C8, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>5</sup>Centro de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, Portugal

<sup>6</sup>Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

Several by-products such as essential oils and extracts from medicinal and aromatic plants (MAP) can be obtained within the biorefinery concept from forest biomass as they are high value, low volume commodities, extremely attractive for the perfume, cosmetic and flavour industries and are also known to possess different pharmacological activities. *Cupressus lusitanica* Mill (“cipreste-do-Buçaco” in Portuguese), also known as Cedar-of-Goa or Mexican cypress, was introduced in Portugal more than 300 years ago and is still widely used as an ornamental plant and for reforestation [1]. It is frequent in Portuguese landscape, and large amounts of their waste products are obtained from forest management. Recent studies reported for the first time the chemical composition of the essential oil and hydrolate volatiles and their antioxidant and anti-inflammatory properties [2]. The supercritical extraction of the volatile oil of *C. lusitanica* has not been studied in literature. So, the aim of this work was to evaluate the extracting capability of supercritical CO<sub>2</sub>, to recover volatiles contained in *C. lusitanica*, in order to determine its chemical composition and to assess its potential as a source of drug leads.

From Biomass it is not possible to prepare qualified extracts for medicines (Good Agricultural Practices, contaminants, impurities, wastewater ...) but it is possible, for example, to extract compounds with antiviral action, such as ferruginol, the major component of CO<sub>2</sub> extraction.

### References

[1] Proença da Cunha, A., Roque, O.R., Nogueira, M.T. (2012). Plantas Aromáticas e óleos Essenciais. Composição e Aplicações. Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

[2] Tavares, C. S.; Martins, A.; Faleiro, M. L.; Miguel, M. G.; Duarte, L. C.; Gameiro, J. A.; Roseiro, L. B.; Figueiredo, A. C., (2020) Bioproducts from forest biomass: Essential oils and hydrolates from wastes of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L. *Industrial Crops and Products* 144, 112034. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112034



## Poster Communications

### PC #1 Naturally occurring diterpenoids from *Plectranthus mutabilis* Codd. with cytotoxic Activity

Epole Ntungwe<sup>1,2</sup>, Vera Isca<sup>1,3</sup>, Lucilia Saraiva<sup>4</sup>, Ana María Díaz-Lanza<sup>2</sup>, Attila Hunyadi<sup>5</sup>, Noélia Duarte<sup>3</sup>, Milica Pesic<sup>6</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS – Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Spain

<sup>3</sup>Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>LAQV - Faculty of Pharmacy of University of Porto, Portugal

<sup>5</sup>Institute of Pharmacognosy, University of Szeged, Eötvös str. 6. 6720 Szeged, Hungary

<sup>6</sup>Institute for Biological Research Siniša Stanković, University of Belgrade, Serbia

\* email: [patricia.rijo@ulusofona.pt](mailto:patricia.rijo@ulusofona.pt)

Despite the great development in Human medicine, cancer is still a serious threat to public health and consequently, research on new anticancer agents should be continued [1]. Natural products from medicinal plants (e.g., *Plectranthus* species) continue to be a substantial resource to treat different diseases, particularly in developing countries [2]. *Plectranthus* species are rich in diterpenoids, which are reported to be responsible for various pharmacological activities such as cytotoxic activity [3]. *P. mutabilis* Codd. is a perennial succulent herb containing Nepetoidins A and Nepetoidins B in its essential oils and have limited information available in the literature [4].

In this study, we performed an ultrasound-assisted acetone extraction of air-dried *P. mutabilis* whole plant followed by a bio-guided fractionation using the *Artemia salina* general toxicity assay that resulted in the identification of four compounds: Coleon U quinone (1), 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ - Epoxycoleon U quinone (2), Coleon U (3) and 7-hydro,14-deoxycoleon U (4) [4]. The cytotoxicity of the isolated compounds and *P. mutabilis* extract was evaluated using a model system of sensitive (NCI-H460) and MDR (NCI-H460/R) cells, along with normal human embryonal bronchial epithelial cells (MRC-5). Studies of modulation of P-gp activity are ongoing to unveil the interaction of these compounds and extract with P-gp.

**Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the financial support under the reference CBIOS/COFAC/FIPID/1/2019, UIDB/50006/2020, UID/MULTI/04378/2013, and projects UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020,, CBIOS/COFAC/FIPID/1/2019 and COFAC/ILIND/CBIOS/1/2020. This work was also supported by PADDIC 2019 (ALIES-COFAC) as part of the PhD Program in Health Sciences from Universidad de Alcalá and Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

#### References

- [1] Mothana, R. A., Khaled, J. M., Noman, O. M., Kumar, A., Alajmi, M. F., Al-Rehaily, A. J., & Kurkcuoglu, M. (2018). Phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 237.
- [2] Ntungwe, E., Domínguez-Martín, E. M., Teodósio, C., Teixidó-Trujillo, S., Armas Capote, N., Saraiva, L., Díaz-Lanza, A. M., Duarte, N., & Rijo, P. (2021). Preliminary Biological Activity Screening of *Plectranthus* spp. Extracts for the Search of Anticancer Lead Molecules. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(5), 402.
- [3]. Matias, D., Nicolai, M., Saraiva, L., Pinheiro, R., Faustino, C., Diaz Lanza, A., Pinto Reis, C., Stankovic, T., Dinic, J., Pesic, M., & Rijo, P. (2019). Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS omega*, 4(5), 8094–8103.
- [4] Grayer, R. J., Eckert, M. R., Veitch, N. C., Kite, G. C., Marin, P. D., Kokubun, T., Simmonds, M. S., & Paton, A. J. (2003). The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*, 64(2), 519–528.



## PC #2 Natural diterpenoids from *Plectranthus* spp. as anti-apoptotic agents

Vera M. S. Isca<sup>1,2</sup>, Epole Ntungwe<sup>1,3</sup>, Eva Domínguez-Martín<sup>1,3</sup>, Tomasz Śliwiński<sup>4</sup>, Przemysław Sitarek<sup>5</sup>, Tomasz Kowalczyk<sup>6</sup>, Michał Bijak<sup>7</sup>, Carlos Afonso<sup>2</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>iMed.Lisboa, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Faculty of Pharmacy, Department of Biomedical Sciences, Pharmacology Area (Pharmacognosy Laboratory), University of Alcalá de Henares, Spain

<sup>4</sup> Laboratory of Medical Genetics, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

<sup>5</sup> Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical University of Lodz, Poland

<sup>6</sup> Department of Molecular Biotechnology and Genetics, University of Lodz, Poland

<sup>7</sup> Biohazard Prevention Centre, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland

\* email: [patricia.rijo@ulusofona.pt](mailto:patricia.rijo@ulusofona.pt)

Medicinal plants have been used for centuries to treat several illnesses. *Plectranthus* plants (Lamiaceae) are widely known for their ethnomedicinal uses [1]. Consequently, several bioactive abietane diterpenes were already discovered in *Plectranthus* spp., such as Parvifloron D (**Parv**) [2], 7 $\beta$ ,6 $\beta$ -Dihydroxyroyleanone (**Diroy**) [3], 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone (**Roy**) [3], and 6,7-dehydroroyleanone (**Deroy**) [4].

In this study, we explored the cytotoxic effect of **Roy**, **Deroy**, **Diroy**, and **Parv** in acute lymphocytic leukemia (CCRF-CEM) and lung adenocarcinoma cell lines (A549) and their ability to induce apoptosis.

The natural diterpenoids tested induced cell apoptosis by altering the level of pro- and anti-apoptotic genes and, consequently, inhibited the proliferation of CCRF-CEM and A549 cells in vitro. **Roy** and **Parv** displayed the most promising results in both human cancer cell lines, changing the permeability mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) levels. Consequently, **Roy** and **Parv** could be used in the future as natural chemotherapeutic agents.

**Acknowledgments:** The authors thank Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal for the projects UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020, and grants CBIOS/PRUID/BI1/2017 and SFRH/BD/137671/2018.

### References

[1] Ladeiras, D., Monteiro, C. M., Pereira, F., Reis, C. P., Afonso, C. A., & Rijo, P. (2016). Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones. *Current pharmaceutical design*, 22(12), 1682–1714.

[2] Burmistrova, O., Perdomo, J., Simões, M. F., Rijo, P., Quintana, J., & Estévez, F. (2015). The abietane diterpenoid parvifloron D from *Plectranthus ecklonii* is a potent apoptotic inducer in human leukemia cells. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 22(11), 1009–1016.

[3] Matias, D., Nicolai, M., Saraiva, L., Pinheiro, R., Faustino, C., Diaz Lanza, A., Pinto Reis, C., Stankovic, T., Dinic, J., Pesic, M., & Rijo, P. (2019). Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS omega*, 4(5), 8094–8103.

[4] Garcia, C., Silva, C. O., Monteiro, C. M., Nicolai, M., Viana, A., Andrade, J. M., Barasoain, I., Stankovic, T., Quintana, J., Hernández, I., González, I., Estévez, F., Díaz-Lanza, A. M., Reis, C. P., Afonso, C. A., Pesic, M., & Rijo, P. (2018). Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction. *Future medicinal chemistry*, 10(10), 1177–1189.





## PC #3 Synopsis of the Bioactivity of Abietane Diterpene isolated from *Plectranthus ecklonii* Benth

Gabrielle Bangay<sup>1</sup>, Eva María Domínguez-Martín<sup>1,2</sup>, Ana Margarida Antão<sup>1,3</sup>, EpoleNtungwe<sup>1,2</sup>, Vera Isca<sup>1,3</sup>, Ana María Díaz-Lanza<sup>2</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá de Henares, Ctra. A2, Km 33.100 – Campus Universitario, 28805. Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal.

\*email: [patricia.rijo@ulusofona.pt](mailto:patricia.rijo@ulusofona.pt)

In recent years, the world has witnessed a resurgence in the use of herbal medicine, as an alternative and complimentary approach to the prevention and treatment of disease. It is estimated there are around 28,137 recorded medicinal plants, from which, species of the Lamiaceae family are popularly used for their medicinal properties and application, especially in folk medicine. In particular, species of the *Plectranthus* genus have widespread ethnobotanical and traditional uses. In parts of southern Africa, *Plectranthus ecklonii* Benth., is used to treat tuberculosis- and listeriosis-related problems, gastrointestinal infections and skin diseases [1]. The broad catalogue of uses suggests that this species, and others from the same genus, are promising plants for the discovery of medicinal compounds. *Plectranthus* species contain many bioactive compounds and exhibit several biological effects, including anti-inflammatory, antioxidant, anti-infective and antitumour [2]. In this work, search terms, including ‘*Plectranthus ecklonii*’, ‘parvifloron D’, ‘parvifloron E’, ‘parvifloron F’ and ‘sugiol’, were used and databases, including PubMed, Web of Science and ScienceDirect, were examined. Herein lies the information currently present in the literature on the isolated abietane diterpenes of *P. ecklonii*, parvifloron D, E, F and sugiol, and comments on their bioactivities, in order to reveal their potential for novel pharmaceutical drug development [3].

**Acknowledgments:** This research was funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), through projects UIDP/04567/2020 and UIDB/04567/2020. E.M.D-M gratefully acknowledges being the recipient of a predoctoral FPU 2019 fellowship from the University of Alcalá de Henares.

### References

- [1] Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., & Paton, A.J. (2006). *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1–24.
- [2] Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C., Oliveira, C., Díaz-Lanza, A., Reis, C., Duarte, N. and Rijo, P. (2019). Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 24(36), 4207–4236.
- [3] Sitarek, P., Toma, M., Ntungwe, E., Kowalczyk, T., Skała, E., Wiczfinska, J., Śliwiński, T. and Rijo, P. (2020). Insight the Biological Activities of Selected Abietane Diterpenes Isolated from *Plectranthus* spp. *Biomolecules*, 10(2), 194.



## PC #4 LOXL2 inhibitory activity of pimaranes from medicinal plants

Sandra Ferreira<sup>1</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,2</sup>, Ana S. Fernandes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS, Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, Lisbon 1749-024, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

\*email: [ana.fernandes@ulusofona.pt](mailto:ana.fernandes@ulusofona.pt)

LOX (Lysyl oxidase) and LOXL 1-4 are amine oxidases, that catalyze the cross-linking of elastin and collagen in the extracellular matrix of tumors, facilitating the formation of metastases. LOXL2 inhibitors have been suggested as a promising treatment to prevent metastasis and invasion of breast cancer [1]. These compounds may also have clinical interest in fibrotic diseases. BAPN ( $\beta$ -aminopropionitrile) is a phytochemical compound that was the first LOX inhibitor known. Medicinal plants are important sources of natural bioactive products and constitute a potential source of novel LOXL2 inhibitors, such as pimarane diterpenoids [2]. In this work, two pimaranes, lagascatriol (1) and 7, 15-isopimaradien-19-ol (2) were tested [3]. Pimarane-type diterpenoids are a potential source of novel human LOXL2 (hLOXL2) inhibitors. These bioactive compounds have been described for their therapeutic properties like antitumor, anti-inflammatory, analgesic and antibacterial activities [2]. However, their effect on LOXL2 activity was never studied before. For the screening of the LOXL2 inhibitory activity of these compounds, the Amplex ultra red (AUR) technique was used [4]. The method was validated using BAPN, and an IC<sub>50</sub> value in accordance with previous reports was obtained [4]. Our results indicate that pimarane 1 has no inhibitory activity for LOXL2. For pimarane 2, an IC<sub>50</sub> value of 174  $\mu$ M was found. Although the pimarane 2 has the ability to inhibit LOXL2, it presents a very high IC<sub>50</sub> value when comparing to the positive control BAPN. Further studies will be carried out to identify novel compounds able to inhibit LOXL2 with potential therapeutic interest.

**Acknowledgments:** 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 COFAC/ILIND (ILIND/F+/EI/01/2020).

### References

- [1] Ferreira, S., Saraiva, N., Rijo, P., & Fernandes, A. S. (2021). LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 312.
- [2] Isca, V., Andrade, J., Fernandes, A. S., Paixão, P., Uriel, C., Gómez, A. M., Duarte, N., & Rijo, P. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4250..
- [3] Reveglia, P., Cimmino, A., Masi, M., Nocera, P., Berova, N., Ellestad, G., & Evidente, A. (2018). Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity. *Chirality*, 30(10), 1115–1134..
- [4] 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.



## PC #5 Antioxidant, antimicrobial activity and general toxicity of methanolic ultrasound-assisted *Plectranthus* spp. extracts and their potential use in dermocosmetics

Márcia Santos Filipe, Catarina Rosado, Patrícia Rijo\*

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

\*email: [patricia.rijo@ulusofona.pt](mailto:patricia.rijo@ulusofona.pt)

The search for natural products as active ingredients in cosmetics has gained strength due to the large demand from the general population concerned with daily care and health. *Plectranthus* spp. is a well-known genus used in traditional medicine for skin conditions. It belongs to the Lamiaceae family that grows in the warm and tropical areas of the globe. The aim of this study is to select, through literature, *Plectranthus* species related to skin disorders and evaluate their antioxidant, antimicrobial activities and general toxicity for its potential cosmetological use. Considering the ethnopharmacological use, 8 species were selected (*P. amboinicus*, *P. barbatus*, *P. cylindraceus*, *P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. grandidentatus*, *P. hadiensis* and *P. madagascariensis*).

Methanolic ultrasound-assisted extracts were prepared for all eight selected species (10% (w/v)). The antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH radical method, using the extracts at 10 mg/mL. The extracts of *P. ecklonii* and *P. grandidentatus* showed high antioxidant activity - 98,15% and 72,34% respectively.

All extracts were screened for their antimicrobial activity, using the microdilution test at 10 mg/mL, against Gram-positive bacteria and yeast strains related to skin microbiota (*S. aureus* and *C. albicans*). The extracts of *P. amboinicus*, *P. fruticosus*, *P. grandidentatus*, *P. hadiensis* and *P. madagascariensis* showed moderated antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and yeasts tested.

The general toxicity was tested using the *Artemia salina* L. model and was tested at 0.1 mg/mL. None of the extracts were revealed to be toxic.

The *Plectranthus* extracts seem to be promising ingredients to be used in dermocosmetic formulations. However, further studies addressing safety, namely cytotoxicity, and other areas of efficacy, such as physical and chemical stability must be conducted.

**Acknowledgments:** This research was funded by *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (FCT, Portugal), through projects UIDP/04567/2020 and UIDB/04567/2020.



## PC #6 Mutagenic and antimutagenic activity of Myrtle extracts

Maria Paula Duarte<sup>1</sup>; Paula Pereira<sup>2,3</sup>; Katelene Lima<sup>1</sup>; Elisabete Maurício<sup>2,4</sup>; Maria João Cebola<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>MEtRICs/DCTB - NOVA School of Science and Technology, Universidade NOVA de Lisboa,  
Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal.

<sup>2</sup>CBIOS - Universidade Lusófona Research Centre for Biosciences and Health Technologies, ULHT, Av. Campo Grande,  
376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup>CERENA - Centre for Natural Resources and the Environment, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av.  
Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.

<sup>4</sup>Elisa Câmara, Lda, Dermocosmética, Centro Empresarial de Talaide, n<sup>o</sup> 7 e 8, 2785-723, S. Domingos de Rana, Portugal.

email: [mpcd@fct.unl.pt](mailto:mpcd@fct.unl.pt)

*Myrtus communis* L. is an evergreen shrub belonging to the Myrtaceae family that grows wild around all the Mediterranean region, Portugal included. Many medicinal properties have been attributed to myrtle, which has been used since ancient times in folk medicine. It is traditionally used as an antiseptic disinfectant, with anti-hemorrhagic, antimicrobial and antioxidant properties. Toxicity screening, particularly the study of the mutagenicity, is a necessary aspect of the preliminary safety evaluation of plant-derived extracts and compounds prior to further development and commercialization [1]. On the other hand, the search for antimutagenic agents is an important one, since such compounds maybe helpful in preventing cancer and other mutation-related diseases [2].

In this study, the mutagenic and antimutagenic activities of a supercritical myrtle extract was assessed using the Salmonella mutagenicity assay (Ames test). No mutagenic effects were observed for concentrations up to 5.0 mg/plate, which corresponds to the recommended maximum test concentration according to the OECD guidelines for testing of chemicals. On the other hand, the extract was able to inhibit up to 45% the mutagenic activity of tert-Butyl hydroperoxide. As tert-Butyl hydroperoxide is an oxidative mutagen, the antimutagenic effect could be related to the antioxidant activity of the extract. The antimutagenic activity detected could make this extract a promising candidate for future applications in human healthcare.

**Acknowledgments:** This work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, through funding UID/DTP/04567/2019 and UIDB/0456/2020.

### References

[1] Eloff, J.N. and McGaw, L.J. (2006). Plant Extracts Used to Manage Bacterial, Fungal, and Parasitic Infections in Southern Africa. In Modern Phytomedicine (eds I. Ahmad, F. Aqil and M. Owais). <https://doi.org/10.1002/9783527609987.ch5>.

[2] Chandela, M., Kumara, M., Kumarb S., Kaur, S. (2012) Inhibition of 2-aminofluorene and 4-nitro-O-phenylenediamine mutagenicity by natural food colorant plant *Rubia cordifolia* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 235-239.

## PC #7 Initial studies on the phytochemical and antitumoral activity of *Plectranthus hadiensis* (Forssk.) Schweinf. ex Sprenger aerial parts

Eva María Domínguez-Martín<sup>1,2</sup>, Epole Ntungwe<sup>1,2</sup>, Catarina Teodosio<sup>1</sup>, Vera Isca<sup>1,3</sup>, Gabrielle Bangay<sup>1</sup>, Ana María Díaz-Lanza<sup>2\*</sup>, Patrícia Rijo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies- CBIOS, Bio.Natural Lab. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal.

<sup>2</sup> University of Alcalá de Henares, Faculty of Pharmacy, Department of Biomedical Sciences, Pharmacology Area (Pharmacognosy Laboratory), New antitumor compounds: Toxic action on leukemia cells research group. Ctra. A2, Km 33.100 – Campus Universitario, 28805. Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> University of Lisbon, Faculty of Pharmacy, Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), 1649-003 Lisbon, Portugal.

\*email: patricia.rijo@ulusofona.pt

The *Plectranthus* genus belongs to the Lamiaceae family and consists of around 300 species distributed from Africa to Asia and Australia. Several studies have reported that *Plectranthus* species are rich in abietane-type diterpenes, such as royleanones, which are interesting in the treatment of various diseases. One of such species is *Plectranthus hadiensis* (Forssk.) Schweinf. ex Sprenger, which has been documented to be useful in several types of cancer [1]. The objective of this work is to present the preliminary results of extraction, fractionation, isolation and bioactivity of the aerial parts of this plant. These data indicate a great difference between the acetonic extracts from leaves and those from stems, mainly in their content of 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone (Figure 1), which has cytotoxic properties [2,3]. Currently, phytochemical studies are ongoing to elucidate the main abietanes responsible for the biological activity.

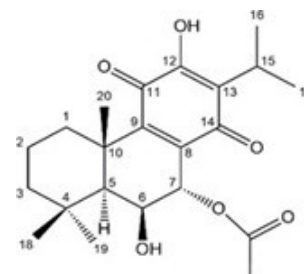


Figure 1. Structure of 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone

**Acknowledgments:** This work was supported in part by FCT – *Fundação para a Ciência e Tecnologia* grants PEst-OE/SAU/UI4013/2014, UID/DTP/04567/ 2016, UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020.

E.M.D-M gratefully acknowledges being the recipient of a predoctoral FPU 2019 fellowship from University of Alcalá.

### References

- [1] Schultz, F., Anywar, G., Wack, B., Quave, C. L., & Garbe, L. A. (2020). Ethnobotanical study of selected medicinal plants traditionally used in the rural Greater Mpigi region of Uganda. *Journal of ethnopharmacology*, 256, 112742.
- [2] Sitarek, P., Toma, M., Ntungwe, E., Kowalczyk, T., Skała, E., Wiczfinska, J., Śliwiński, T., & Rijo, P. (2020). Insight the Biological Activities of Selected Abietane Diterpenes Isolated from *Plectranthus* spp. *Biomolecules*, 10(2), 194.
- [3] Śliwiński, T., Sitarek, P., Skała, E., Isca, V., Synowiec, E., Kowalczyk, T., Bijak, M., & Rijo, P. (2020). Diterpenoids from *Plectranthus* spp. as Potential Chemotherapeutic Agents via Apoptosis. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(6), 123.



## PC #8 Glycine-based IL to improve the performance of O/W emulsions containing rutin

Ana Júlio<sup>1,2</sup>, Rita Caparica<sup>1,2</sup>, Filipe Fernandes<sup>3</sup>, João Guilherme Costa<sup>1</sup>, Tânia Santos deAlmeida<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain.

<sup>3</sup>School of Sciences and Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376,1749-024 Lisboa, Portugal.

\*email: [tania.almeida@ulusofona.pt](mailto:tania.almeida@ulusofona.pt)

The development of new drug delivery systems faces several challenges, like the poor drug solubility of many substances, such as phenolic compounds, as well as the low stability of various delivery systems [1-2].

Rutin is a polyphenolic bioflavonoid widely found in natural sources, including fruits (e.g., apples, grapes, lemons), vegetables (e.g., carrots, potatoes), and beverages (e.g., tea and wine) [2]. In the last years, several relevant pharmacological activities have been attributed to this phenolic compound, including antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, antimicrobial, and anticancer [2]. Hence, this compound presents vast potential, but since it presents low aqueous solubility its incorporation into delivery systems may be impaired.

Considering this, ionic liquids (ILs) are a multifunctional tool that may be valuable to overcome this challenge [2,3].

Thus, this work aimed to study the influence of the biobased IL (2- hydroxyethyl)trimethylammonium-L-glycinate [Cho][Gly], on the solubility and loading of rutin into oil-in-water (O/W) emulsions and to access its impact on the stability of the developed formulations.

Our results showed that the [Cho][Gly] allowed a considerable increase in the solubility of rutin, even compared with other previously studied ILs, thus granting a higher rutin loading into the emulsions. This IL was also crucial to stabilize the developed formulations.

**Acknowledgments:** This work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, through funding UID/DTP/04567/2019 and UIDB/0456/2020 (both general funding to CBIOS), and by funding from Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programme FIPID 2019/2020). A.J. and R.C. would like to thank ALIES for the grant PADDIC 2018-2019 and PADDIC 2019-20.

### References

- [1] Fernández-García, R., Lalatsa, A., Statts, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2020). Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International journal of pharmaceutics*, 573, 118817.
- [2] Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2020). Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*, 10(2), 233. MDPI AG..
- [3] Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, M., Baby, A. R., Rosado, C., & Mota, J. P. (2017). Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(11), 1858–1865.

# BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO  
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

## Contents / Conteúdos

- 1** **Editorial: This issue in brief – a renewed vision**  
*Este numero em breves notas - uma visão renovada*  
L. Monteiro Rodrigues
- 4** **Impact of the year of graduation on the positioning of nutrition professionals regarding the vegetarian diet**  
*Impacto do ano de formação no posicionamento dos profissionais de nutrição face à dieta vegetariana*  
Aline Ambrósio, Leticia Vasconcelos, Marta Raposo, Cíntia Ferreira-Pêgo
- 15** **Body composition assessment of vegetarian-vegan and omnivore young women – an exploratory study**  
*Avaliação da composição corporal de mulheres jovens vegetarianas e omnívoras - um estudo exploratório*  
Cíntia Ferreira-Pêgo, Rejane Giacomelli Tavares, Sofia Lopes, Tatiana Fontes, Luís Monteiro Rodrigues
- 25** **Antioxidant activities and antidiabetic potential of extract of fruits from the *Myrtaceae* family: inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities**  
*Atividade antioxidante e potencial antidiabético de extratos de frutos da família Myrtaceae: efeito inibitório na atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase*  
Simone Muniz Pacheco, Mauricio Seifert, Rafael de Almeida Schiavon, Maiara Sandrielly Pereira Soares, Rejane Giacomelli Tavares, Mauricio Seifert, Leonardo Nora
- 38** **Topically applied methyl nicotinate evokes a temporary inflammation on human skin**  
*Meilnicotinato aplicado topicamente evoca uma inflamação temporária na pele humana*  
Sérgio Faloni de Andrade, Clemente Rocha, Luís Monteiro Rodrigues
- 48** **Systemic treatment of HER2-positive breast cancer patients with brain metastases: current status and exploratory case study in a Portuguese cohort**  
*Tratamento sistémico do carcinoma de mama HER2 positivo com metástases cerebrais: estado atual e estudo exploratório de casos numa coorte portuguesa*  
Paulo Luz, Elsa Campoa, Rita Gameiro, Marta Vaz, Isabel Fernandes, Joana Magalhães, Beatriz Gosalbez, Sofia Braga, João Guilherme Costa, Ana Sofia Fernandes
- 62** **Herpetiform dermatitis (Clinical case)**  
*Dermatite herpetiforme (Caso clínico)*  
Bruno Sousa, Nelson Tavares
- 68** **Type 1 medication review based on a pharmacy's electronic medication records: first steps towards an algorithm to stratify patients for tailored pharmacy services**  
*Revisão terapêutica tipo 1 com base nos registos eletrónicos da farmácia: primeiros passos para o desenho de um algoritmo que permite estratificar doentes para a prestação de serviços de farmácia personalizados*  
Ligia Reis, Miguel Monteiro, Luis Lourenço, João Gregório
- 83** **Acceptability of kefir produced by fermentation of Portuguese milk with CIDCA AGK1 grains in a sample of Portuguese consumers**  
*Aceitabilidade do kefir produzido pela fermentação do leite português com grãos CIDCA AGK1 numa amostra de consumidores portugueses*  
Emília Alves, Patrícia Rijo, Luís Monteiro Rodrigues, Catarina Rosado
- 92** **Preliminary sensory evaluation of grape pomace flour sweet cookies**  
*Avaliação sensorial preliminar de bolachas doces de farinha de bagaço de uva*  
M. Lídia Palma, Cíntia Ferreira-Pêgo, Marisa Nicolai, Paula Pereira
- 103** **Use of chromium-enriched yeast in the manufacture of French bread**  
*Utilização de levedura enriquecida em crómio no fabrico de pão tipo Francês*  
Carla Sá, Ana Barata, Carla Ramalho, M. Cristiana Nunes, Nelson Tavares
- 114** **General Toxicity screening of Royleanone derivatives using an *Artemia salina* model**  
*Avaliação da toxicidade geral de derivados de Roileanonas pelo ensaio de letalidade de Artemia salina*  
Epole Ntungwe, Vera M. S. Isca, Ana María Díaz-Lanza, Carlos A. M. Afonso, Patrícia Rijo
- 123** **Preliminary safety evaluation of n-butanol from the collagen extraction process and of collagen extract from *Oreochromis niloticus* (tilapia) skin oriented for dermocosmetics**  
*Avaliação preliminar da segurança do n-butanol do processo de extração de colágeno e do extrato de colágeno da pele de Oreochromis niloticus (tilápia) para uso dermocosmético*  
Linda Sánchez-Tuesta, Nataly Reátegui-Pinedo, David Salirrosas, Ana Lucía Morocho-Jácome, Fernanda Daud Sarruf, Renata Miliani Martínez, Roberto Quevedo-León, Ramiro Fiestas, Carmen Ayala-Jara, André Rolim Baby, Zulita Adriana
- Supplement | Suplemento**
- S139** **Book of Abstracts - Fascination of Plants Day 2021 - “Get to know herbal medicines better”**  
*Livro de Resumos - Dia Internacional do Fascínio das Plantas 2021 - “Vem conhecer melhor os Medicamentos à base de plantas”*