

Biomed Biopharm Res
19(1) 156 – S263 (2022)

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. 19, No. 1

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

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

Editor in chief / Editor Coordenador

Luís Monteiro Rodrigues

Emeritus Editor in chief / Editor Coordenador Emeriti

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

Executive Editors / Editores Executivos

Ana Fernandes - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal

Anabela Mota Pinto - Instituto Patologia Geral Fac Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

André Baby - Departamento de Farmácia da FCF, Universidade de São Paulo, Brasil

Antero Abrunhosa - Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde U Coimbra, Portugal

Candida Aparecida Kassuia - Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

Carlos Nunes Filipe - NOVA Medical School, Portugal

Catarina F Rosado - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal

Domingos Ferreira - Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, Portugal

Edson Maistro - Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Marília, SP, Brasil

Eduardo Colombari - FMDUSP-RP, Brasil

Isabel Ferreira - Instituto Politécnico de Bragança, Centro de Investigação da Montanha, Portugal

Michel Otuki - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

Patricia M. Rijo - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal

Patricia Maia Campos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil

Patricia Rinken Rocco - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Sergio Faloni Andrade - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal

Consulting Editors / Editores Consultores

Afonso Cavaco - Fac. Farmácia, U Lisboa, PT

Alda Pereira - IPMPH, Fac. Med -U Lisboa, PT

Alain Pierre Gadeaux - INSERM, Bordeaux, France

Amílcar Roberto - CBIOS, U Lusofona, PT

Anabela Neves - IML, NOVAMS, Portugal

Ana Paula Ribeiro - Fac. Med UNISA, LaBiREM, LAME, BR

Ana Valente - U Atlantica, PT

Antonio Raposo - CBIOS U Lusofona, PT

Carla Correia de Sá - IPP, PT

Carla Pires, INPI, PT

Carolina Panis - UNIOESTE, BR

Catarina Pinto Reis, FF, U Lisboa, P

Célia Faustino - FF, U Lisboa, PT

Cid Aimbiré - SPFGnosia, BR

Cintia Maia Braga - UNIVALI, BR

Cristiana Nunes - ISA, U Lisboa, PT

Damas Macaia - IHMT, U Nova de Lisboa, PT

Daniela Cabrini - UF Paraná, BR

Dele Raheem - Arct Centre, U Lapland, FI

Eliana Cortez, MA, US

Eliane Ayres - UEMG, BR

Elisabeth Neumann - UFMG, BR

Fabiana Vieira Lima - UFES, BR

Fernando Llimos - FF, U Porto, PT

Gabriela Pereira, IMED U Lisboa, PT

Guilherme Tavares - UF Juiz de Fora, BR

Helena Margarida Ribeiro - FF, U Lisboa, PT

Hernâni Pombas Caniço - Fac Med, U Coimbra, PT

Hugo Silva - IT, U Lisboa, PT

Hugo TD Ferreira - IBEB FC U Lisboa, PT

Isabel Almeida - FF, U Porto, PT

Isabel Vitória Figueiredo - FF, U Coimbra, PT

Joao Gregorio - CBIOS, U Lusofona, PT

José Delgado Alves - GEPOG, NOVA Med Sch, PT

José Roseiro - LNEG, PT

Joyce Costa - UFVJM, BR

Laurent Duca - U Reims Champagne-Ardenne, FR

Liliana Castanheira Mendes - UCSP Estoril, PT

Luis Lapão - INMT - NMS, PT

Madalena Sofia Oliveira - Inst U Ciências Saúde, CESPU, PT

Maria Helena Verdan - U Paraná, BR

Maria Valéria Robles Velasco - FCF U São Paulo, BR

Maria Vitorina Aguilár - UAH, ES

Mafalda Ferreira - U Coimbra, Fac Med PT

Márcia Melhado - USP - São Paulo, BR

Margarida Alves - CBIOS U Lusofona, PT

Margarida Caramona - FF, U Coimbra, PT

Margarida Castel-Branco - FF, U Coimbra, PT

Margarida Figueiredo Dias - HUC, Coimbra, PT

Maria Claudia Issa - UFF, Niterói-Rio de Janeiro, BR

Marina Pinheiro - U Porto, PT

Marisa Nicolai - CBIOS U Lusofona, PT

Mateus Freire Leite - U Federal de Alfenas, BR

Mirela Seixas - ADCO, SP, BR

Nuno Oliveira - FF, U Lisboa, PT

Odoaldo Rochefort - IFRS, BR

Patricia Fradinho - ISA U Lisboa, PT

Rejane Tavares - CBIOS, U Lusofona, PT

Regina Meneses - CBIOS, U Lusofona, PT

Ricardo Afonso - SPCAL e NOVA Medical Sch, PT

Sara Cordeiro - QU, Belfast, IR

Sara Santos Bernardes - UFMG, BR

Susana Nunes Silva - U NOVA Lisboa, PT

Susana Caldas Fonseca - FC U Porto, PT

Suzana Carvalho - UE Paulista Júlio de Mesquita UNESP, BR

Tania Almeida - CBIOS, U Lusofona, PT

Tiago Atalaia - ESSCVP, PT

Vania Leite e Silva - UNIFESP, BR

Valquíria Villas Boas - U Caxias do Sul, BR

Walter Antônio Roman Junior -UNOCHAPECO, BR

Property / Propriedade

ALIES

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

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

ALIES

Av Campo Grande, 376

1749-024 Lisboa, Portugal

Tel: +351217515550 Fax: +351217515598

Electronic correspondence /

Correspondencia electrónica

directorales@alies.pt

bbr_office@alies.pt

Electronic Edition / Edição electrónica

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

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

Distribution / Distribuição

ALIES

Dep. Legal: 33195511

ISSN Print: 2182-2360

ISSN Online: 2182-2379

Communication Manager /

Gerente de Comunicação

Patricia M. Rijo

Production Manager / Gerente de Produção

Amanda B. Rodrigues

Website Manager / Gerente de Website

Clemente Rocha

Scientific Partners / Parceiros Científicos



Universidade Extremo Sul Catarinense



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

1933

CAMPUS DIADEMA





Luís Monteiro Rodrigues

Editor

BBR 19.1

This issue in brief

The **Biomedical Sciences** section starts with a study on the municipalization of health in Angola, focused on the province of Cabinda. This is a major exploratory paper focusing on the needs of human resources in health, essential for the future and an example for the countries of our Lusophone community (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.274](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.274))

The three articles that continue this section are from the area of human Nutrition and Food. An original study applied to more than three hundred mothers sought to establish the factors influencing the duration of breastfeeding among mothers in Portugal, identifying education and information as essential to improve related indicators (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.276](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.276))

In continuation, another original study on the anthropometric assessment of preschool and school children in European Macaronesia is presented. This manuscript completes a series of articles developed on the same theme in this geographical region, exposing some particularities and needs that contribute to improved development of these children and future adults which should be drawn to the attention of education and health authorities (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.278](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.278))

The following article discusses food insecurity in households in the Algarve. This study follows the first assessment of food insecurity carried out by the Regional Food Security Observatory and may contribute to improving intervention methodologies in these areas (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.282](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.282))

Another original paper on the importance of movement in maintaining peripheral circulatory function follows. This work is part of a Ph.D. project whose authors have previously shared some of their findings within our journal. This particular study focuses on the impact of plantar flexion, thinking about the application of this knowledge in a Home-health context (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.286](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.286))

Finally, this section closes with an important exploratory short-paper aimed at gauging the preparedness of community pharmacy professionals to train on the administration of adrenaline via autoinjectors - the first-line (self) treatment of anaphylaxis. These findings should be of interest to both educational and professional authorities (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.287](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.287))

Este número em breves notas

A secção de **Ciências Biomédicas** começa com um estudo sobre a municipalização da saúde em Angola, focado na província de Cabinda. Trata-se de um documento exploratório da maior importância focando as necessidades dos recursos humanos em saúde, essencial para o futuro e um exemplo para os Países da nossa comunidade lusófona (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.274](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.274))

Os três artigos que dão continuidade a esta secção são da área da Nutrição e Alimentação humanas. Um estudo original aplicado a mais de trezentas mães portuguesas procura estabelecer os fatores que influenciam a duração do aleitamento materno entre as mães no nosso País, identificando a educação e informação como essenciais para melhorar os indicadores relacionados (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.276](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.276))

Em continuação, apresenta-se outro estudo original sobre a avaliação antropométrica de crianças em idade pré-escolar e escolar da Macaronésia Europeia. Este manuscrito completa uma série de artigos desenvolvidos sobre a mesma temática nesta região geográfica, expondo algumas particularidades e necessidades que contribuam para um melhor desenvolvimento destas crianças e futuros adultos. À atenção das autoridades de educação e de saúde (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.278](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.278))

O artigo seguinte discute a insegurança alimentar nos lares do Algarve. Este estudo surge na sequência da primeira avaliação da insegurança alimentar realizada pelo Observatório Regional da Segurança Alimentar, podendo contribuir para melhorar as metodologias de intervenção nestes domínios (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.282](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.282))

Segue-se um outro artigo original sobre a importância do movimento para manutenção da função circulatória periférica. Este trabalho é parte de um projecto de doutoramento cujos autores já partilharam com o nosso jornal alguns dos seus achados. No caso em concreto focam o impacto da flexão plantar, pensando na aplicação destes conhecimentos em contexto de Home-health (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.286](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.286))

Finalmente esta secção encerra-se com um importante short-paper exploratório visando aferir da preparação dos profissionais das farmácias comunitárias para administrar autoinjectores de adrenalina- o tratamento de primeira linha da anafilaxia. À atenção das autoridades (educacionais e profissionais) competentes (*Biomed Biopharm Res.*, [doi: 10.19277/bbr.19.1.287](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.287))

The manuscript that begins the **Biopharmaceutical Sciences** section is a review of membrane separation technology, critically important in the chemical and pharmaceutical sector. It is spatially focused on electrodialysis. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.285](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.285))

The two articles which follow focus on very recent data on COVID-19 vaccines in Portugal, analyzing the reports on undesirable effects by vaccine type, gender and age until July 2021 (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.277](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.277)) and some of the serious adverse reactions recorded for these vaccines in the same period (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.279](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.279)). To the attention of the appropriate public health authorities.

This section continues with a manuscript on another very current topic in pharmaceutical formulation technology. The focus is on ionic liquids used to improve solubility and aid in the incorporation of diverse compounds into carrier systems. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.280](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.280))

The following article results from a line of research that has been studying the impact of essential oils from plants of indigenous flora on human skin. In this case, the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf is studied and its interest in improving skin hydration is demonstrated (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.284](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.284))

The section closes with another original article on bioactives of natural origin, studying the antioxidant capacity and hepatoprotective effect of ethanolic extract of *A. edulis*. These activities are widely known in traditional medicine, and here important supporting evidence was obtained *in vitro* in mice. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.288](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.288))

This issue also includes two Supplements - the Annual Abstract Book of the November 2021 meeting II Bio.Natural - Bioactive Natural Products Research Meeting (virtual) (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.275](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.275)), and the Book of Abstracts of the 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP held between 03 and 06 November 2021 in Ribeirão Preto, Brazil. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.281](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.281))

L Monteiro Rodrigues
Editor

O manuscrito que inicia a secção de **Ciências Biofarmacêuticas** é uma revisão sobre a tecnologia de separação por membranas tão importante no sector químico e farmacêutico. É espacialmente focada a eletrodialise. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.285](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.285))

Os artigos seguintes focam dados muito recentes sobre as vacinas COVID-19 em Portugal. Dados muito recentes analisam as notificações sobre os efeitos indesejáveis por tipo de vacina, género e idade até julho de 2021 (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.277](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.277)) e algumas das reações adversas graves registadas para essas vacinas no mesmo período (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.279](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.279)). À atenção das autoridades de saúde pública apropriadas.

Esta secção continua com um manuscrito sobre outro tema muito atual em tecnologia de formulação farmacêutica. São focados os líquidos iónicos utilizados para melhorar a solubilidade e auxiliar na incorporação de compostos diversos em sistemas de veiculação. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.280](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.280))

O artigo seguinte resulta de uma linha de pesquisa que vem estudando o impacto de óleos essenciais de plantas da flora autóctone sobre a pele humana. No caso em concreto é estudado o óleo essencial da *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e demonstrado o seu interesse na melhoria da hidratação da pele (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.284](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.284))

A secção encerra com um outro artigo original sobre bioactivos de origem natural, estudando a capacidade antioxidante e o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de *A. edulis* em murganhos, uma vez que estas atividades são amplamente conhecidas no âmbito da medicina tradicional, com importantes evidências obtidas *in vitro*. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.288](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.288))

Este número inclui dois Suplementos adicionais - o Livro de Resumos Anual da reunião II Bio.Natural - Bioactive Natural Products Research Meeting (virtual) de novembro 2021 (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.275](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.275)), e o Livro de Resumos do 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP realizado entre 03 e 06 novembro de 2021 em Ribeirão Preto, Brazil. (*Biomed Biopharm Res.*, doi: [10.19277/bbr.19.1.281](https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.281))

Exploratory Study on Municipalization of Health in Angola – Characterization of Human Resources for Health staffing and Health Units’ managers’ profile in Healthcare services and Training institutions of Cabinda Province

Estudo Exploratório sobre a Municipalização da Saúde em Angola - Caracterização dos recursos humanos da saúde e do perfil dos gestores das Unidades de Saúde e das instituições de formação na Província de Cabinda

Teresa Macosso¹, Alberto Macosso^{2,a}, Maria do Céu Costa^{1,*}, João Gregório^{1,*†}

¹CBIOS - Universidade Lusófona’s Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²MINSA - Ministério da Saúde de Angola

^aMINSA, retired

*shared senior mentorship

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

Abstract

In Angola, the scarcity of human resources for health (HRH) is well known. Lately, there has been a focus on education and professional training structures, as well as the necessary profile of health units’ managers. The general objective of this study was to describe the perceptions of HRH Managers of Primary Health units of Cabinda Province about HRH training and retention. A cross-sectional observational study was performed, with semi-structured interviews supported by a survey, followed by a focus group, addressed at a convenience sample of HRH and Health Units managers in the province of Cabinda. 10 health units participated, where 13 managers were interviewed. As for the HRH profile, there is a majority of nurses, with a ratio of nurses to physicians of 8.6:1. As for the profile of managers, only three are postgraduate technicians in management. Training schools’ output in the previous year was 746 senior and middle technicians. Managers cited two main areas of improvement as essential to address the HRH imbalances in Cabinda: "Leadership empowerment" and "Improving information system efficiency". Opportunities were identified to improve the training of Health students, retention of HRH and managers of Health and training units in Cabinda. The definition of policies for HRH in Cabinda should focus on improving health teaching and management conditions with a special focus on empowerment of leaderships, and reinforcing the use of management tools and information systems. Desirably, implementing Management, Control and Quality Assurance Systems.

Keywords: Health Workforce; Quality of Health Care; Health Management; Angola

Resumo

Em Angola, a escassez de recursos humanos para a saúde (RHS) é bem conhecida. Ultimamente, tem havido um enfoque nas estruturas de educação e formação profissional, bem como no perfil necessário dos gestores das Unidades de saúde da Província de Cabinda. O objetivo deste estudo foi descrever as perceções dos gestores de RHS das unidades de saúde sobre a formação e retenção de RHS. Foi realizado um estudo observacional transversal, com entrevistas semiestruturadas apoiadas por um inquérito, seguido por um grupo focal, dirigido a uma amostra de conveniência de gestores de RHS e de Unidades de Saúde. Participaram 10 unidades de saúde e foram inquiridos 13 gestores. Quanto aos RHS, há uma maioria de enfermeiros, com um rácio de enfermeiros para médicos de 8,6:1. Quanto ao perfil dos gestores, apenas três são técnicos pós-graduados em gestão. Das escolas de formação saíram 746 técnicos superiores e médios no ano 2018. Duas áreas principais de melhoria foram citadas pelos gestores como cruciais para resolver os desequilíbrios de RHS: "Empoderamento da liderança" e "Melhoria da eficiência do sistema de informação". Foram identificadas oportunidades para melhorar a formação de estudantes, retenção de RHS e gestores de unidades de Saúde em Cabinda. A definição de políticas de RHS em Cabinda deve centrar-se na melhoria do ensino e da gestão de Saúde, com especial ênfase no empoderamento das lideranças e no reforço da utilização de ferramentas de gestão e sistemas de informação. Desejavelmente, implementando Sistemas de Gestão, Controlo e Garantia da Qualidade.

Palavras-chave: Profissionais da Saúde; Qualidade dos Cuidados de Saúde; Gestão da Saúde; Angola

Introduction

The training of health professionals is strategic to strengthen health systems, especially in countries where Human Resources for Health (HRH) are lacking (1). In recent years, several studies have been carried out to characterize and identify the main challenges faced by institutions that train health professionals around the world, and particularly in sub-Saharan Africa (1–3). However, in African Portuguese Speaking Countries (PALOP) this research has only addressed medical training (4). Albeit issues such as training and retention strategies have been present in the research agenda for some time, understanding the role of HRH management in these low-resource settings is a recent approach for policy-makers.

Human Resources for Health are universally recognized as a priority in health systems. This importance has led to several initiatives at the World Health Assembly and at the African Regional Assembly (5,6). These include the 2001 Abuja Declaration (7), which committed governments in the Region to increase financial resources for health including HRH; the 2008 Ouagadougou Declaration (8), on Primary Health Care (PHC) and Health Systems, which identified HRH as a priority for health; and the Luanda Resolution (9) are among the most relevant.

Angola is among the countries where this shortage of health professionals is most felt, across all provinces (10). The province of Cabinda has been a laboratory for studies on organizational, political and practical issues resulting from Angola's HRH strategy. The health system in the province of Cabinda is structured according to the National Health System of Angola (SNSA) (11). The SNSA is structured as follows: i) public subsystem that includes the National Health Service (SNS), Health Services of the Armed Forces and the National Police and also health units linked to public companies; ii) private subsystem that includes philanthropic and profitable health units. The SNS is structured in three levels of care: i) primary or level I, composed of Type I and II Health Posts, Health Centers, Reference Health Centers and Municipal Hospitals; ii) secondary level, the General or Provincial Hospitals and iii) tertiary level, the Central Hospitals (12). Regarding health management, health services provided to the

Introdução

A formação de profissionais de saúde é estratégica para reforçar os sistemas de saúde, especialmente em países onde faltam Recursos Humanos para a Saúde (RHS) (1). Nos últimos anos, foram realizados vários estudos para caracterizar e identificar os principais desafios enfrentados pelas instituições que formam profissionais de saúde em todo o mundo, particularmente na África Subsaariana (1-3). Contudo, nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP), esta investigação apenas se debruçou sobre a formação médica (4). Embora questões como a formação e estratégias de retenção tenham estado presentes na agenda de investigação durante algum tempo, a compreensão do papel da gestão de RHS neste contexto de poucos recursos é uma abordagem bastante recente para os decisores políticos.

A questão dos Recursos Humanos para a Saúde (RHS), universalmente reconhecida como prioritária nos sistemas de saúde, tem conduzido a várias iniciativas, a nível da Assembleia Mundial da Saúde e da Assembleia Regional Africana (5,6). Entre estas iniciativas, a Declaração de Abuja (7), de 2001, que compromete os governos da Região a aumentar os recursos financeiros para a saúde incluindo os RHS; a Declaração de Ouagadougou (8), de 2008, sobre Cuidados de Saúde Primários (CSP) e Sistemas de Saúde, que identificou os RHS como uma prioridade para a saúde; e a Resolução de Luanda (9) estão entre as mais relevantes.

Angola encontra-se entre os países onde esta escassez de profissionais de saúde é mais sentida, sendo transversal a todas as províncias (10). A província de Cabinda tem sido um laboratório de estudos sobre questões organizacionais, políticas e práticas resultantes da estratégia de RHS de Angola. O sistema de saúde na província de Cabinda está estruturado de acordo com o Sistema Nacional de Saúde de Angola (SNSA) (11). O SNSA está estruturado da seguinte forma: i) subsistema público que inclui o Serviço Nacional de Saúde (SNS), Serviços de Saúde das Forças Armadas e da Polícia Nacional e também unidades de saúde ligadas a empresas públicas; ii) subsistema privado que inclui unidades de saúde filantrópicas e rentáveis. O SNS está estruturado em três níveis de cuidados: i) primário ou nível I, composto por Postos de Saúde de Tipo I e II, Centros de Saúde, Centros de Saúde de Referência e Hospitais Municipais; ii) nível secundário, os Hospitais Gerais ou Provinciais e iii) nível terciário, os Hospitais Centrais (12). Relativamente à gestão sanitária, os serviços de saúde prestados à população da província dependem

Table 1 - Professional/inhabitant and beds/inhabitant ratios in Cabinda Province (2018).

Tabela 1 - Rácios profissionais/habitantes e camas/habitantes na província de Cabinda (2018).

Municipality/ Município	Population/ População	No. of physicians / Nº médicos	Physicians per 10,000 inhabitants / Médicos por 10.000 habitantes	No. of Nurses / Nº Enfermeiros	Nurses per 10,000 inhabitants / Enfermeiros por 10.000 habitantes	No. of Laboratory Technicians / Nº Técnicos de Laboratório	Laboratory Technicians per 10,000 inhabitants / Técnicos de Laboratório por 10.000 habitantes	No. of RX technicians / Nº. Técnicos de RX	RX Technicians per 10,000 inhabitants / Técnicos de RX por 10.000 habitantes	No. of Beds / Nº Camas	Beds per 10,000 inhabitants / Camas por 10.000 habitantes
Cabinda	739,182	94	1.2	827	11.1	108	1.4	40	0.5	786	10.6
Cacongo	46,242	7	1.5	111	24	7	1.5	7	1.5	151	32.6
Buco Zau	38,805	9	2.3	83	21.3	8	2	3	0.77	192	49.4
Belize	23,148	3	1.2	78	33.6	6	2.5	3	1.2	199	85.9
TOTAL	847,377	113	1.3	1099	12.9	129	1.5	53	0.6	1328	15.6

population of the province depend on the Provincial Health Secretariat, which is a governmental body with administrative subordination to the Provincial Governor and technical subordination to the Minister of Health. In the municipalities, health services are managed by the Municipal Health Secretariats, with technical subordination to the Provincial Health Secretary and administrative subordination to the Municipal Administrator (11,12).

Angola's National Health System (SNS) has faced a shortage of human resources in quantity and quality to meet the essential needs of the population, although some progress has been made. The precise context that affects the distribution of the health workforce and HRH management practices was assessed with data collected in 2015 and recommendations were made to improve the HRH distribution in Cabinda (10). In 2015, for every 10,000 inhabitants there is 1 physician, 16 nurses, 3 diagnostic and therapeutic technicians, 5 hospital support workers, 11 general workers and 3 health promoters (13). A number still far below ideal to meet the needs of the population (10). In 2019, the number of physicians per 10,000 inhabitants has increased to 2.3 but the number of nurses has remained more stable, at 16.5 per 10,000 inhabitants (14). Macaia and Lapão (15), described a poor distribution of HRH in Cabinda, with geographical imbalances that benefit the urban areas of Cabinda province. The most recent data on professional/inhabitant ratios and beds/inhabitants in the Province of Cabinda is shown in Table 1 (16,17), presenting a slightly better situation than the country's total in 2014/2015 (18), particularly on the distribution of physicians in the province of Cabinda.

In order to face the shortage of HRH, several strategies may exist, among them, the increase in the availability of undergraduate courses for health professionals in the areas in need (19). Fronteira et al. (4) identified the existence of several undergraduate and graduate programs in health at the faculties of Angola, Guinea-

do Secretariado Provincial de Saúde, que é um órgão governamental com subordinação administrativa ao Governador Provincial e subordinação técnica ao Ministro da Saúde. Nos municípios, os serviços de saúde são geridos pelas Secretarias Municipais de Saúde, com subordinação técnica ao Secretário Provincial de Saúde e subordinação administrativa ao Administrador Municipal (11,12).

O Sistema Nacional de Saúde (SNS) de Angola tem enfrentado uma escassez de recursos humanos em quantidade e qualidade para satisfazer as necessidades essenciais da população, embora tenham sido feitos alguns progressos. O contexto preciso que afeta a distribuição do pessoal de saúde e as práticas de gestão de RHS foi avaliado com dados recolhidos em 2015 e foram feitas recomendações para melhorar a distribuição de RHS em Cabinda (10). Em 2015, para cada 10.000 habitantes havia 1 médico, 16 enfermeiros, 3 técnicos de diagnóstico e terapêutica, 5 trabalhadores de apoio hospitalar, 11 trabalhadores indiferenciados e 3 promotores de saúde (13). Um número ainda muito abaixo do ideal para satisfazer as necessidades da população (10). Em 2019, o número de médicos por 10.000 habitantes aumentou para 2,3 mas o número de enfermeiros manteve-se estável, em 16,5 por 10.000 habitantes (14). Macaia e Lapão (15), descreveram uma má distribuição de RHS em Cabinda, com desequilíbrios geográficos que beneficiam as áreas urbanas da província de Cabinda. Na Tabela 1, são apresentados os dados mais recentes sobre número de profissionais/habitante e camas/habitante na província de Cabinda (16,17), apresentando uma situação ligeiramente melhor do que o total do país em 2014/2015 (18), particularmente relativamente à distribuição dos médicos na província de Cabinda.

Para fazer face à escassez de RHS, podem existir várias estratégias, entre elas, o aumento da oferta de cursos de graduação para profissionais de saúde nas áreas carenciadas (19). Fronteira et al. (4),

Bissau and Mozambique. In these countries, one of the main reasons for the shortage of physicians is the limited training capacity of medical schools, due to the high number of candidates for a limited number of places, low graduation rates, lack of infrastructure, labor, poorly qualified teaching staff and dependence on foreign teachers, low teacher salaries, and insufficient infrastructure, among other reasons (4). Macaia and Lapão (15) previously highlighted a significant fluctuation over the years in the number of HRH available, depending on recruitment standards and international cooperation for physicians, and other factors of recruitment and fixation for the remaining professionals. However, the specific training needs of these professionals were not determined.

In the conception of the National Health Development Plan (2012-2025) (10), the deficit of qualified human resources in all areas of the National Health Service in Angola was identified as one of the risk factors for its sustainability. For this reason, the following strategies were defined within in the HRH Management Program, among others: i) improvement in management and planning, ii) reinforcement of skills in the areas of management and planning, iii) improvement in the distribution and establishment of HRH, iv) improvement of the mechanisms and instruments of initial training and v) improvement of continuous training. The level of incentives, wages, and unattractive working conditions were noted as risk factors of the program.

Considering that for any Health System the quality of care is sustained in the definition of the number and qualification of HRH, it is important to investigate, according to the strategies, objectives, and goals recommended in the PNDS of Angola: i) What HRH profile is necessary? ii) What conditions of graduate and postgraduate/continuous training exist to satisfy this profile? iii) What are the characteristics of HRH management at the service level, taking into account the manager's profile, planning, administration, and development? A research project is in progress to contribute to the body of knowledge necessary to answer these questions. The exploratory study presented here is the initiation of the project and intends to describe the perceptions of HRH Managers of Primary Health units of Cabinda Province regarding HRH training and retention policies, while trying to understand if any significant evolution on HRH retention was made in the 2015- 2018 triennium in order to produce specific recommendations for policy-makers.

identificam a existência de vários cursos de graduação e pós-graduação em saúde nas faculdades de Angola, Guiné-Bissau e Moçambique. Nestes países, uma das principais razões para a escassez de médicos é a limitada capacidade de formação das escolas médicas, devido ao elevado número de candidatos e a um baixo número de vagas, baixas taxas de graduação, falta de infraestruturas, mão-de-obra, pessoal docente pouco qualificado e dependência de professores estrangeiros, baixos salários dos professores, e infraestruturas insuficientes, entre outros (4). Macaia e Lapão já destacaram uma flutuação significativa ao longo dos anos no número de RHS disponíveis, dependendo dos padrões de recrutamento e cooperação internacional para médicos, e outros fatores de recrutamento e fixação para os restantes profissionais (15). No entanto, as necessidades específicas de formação destes profissionais não foram diagnosticadas.

Na concepção do Plano Nacional de Desenvolvimento da Saúde (2012-2025) (10), o défice de recursos humanos qualificados em todas as áreas do Serviço Nacional de Saúde em Angola foi identificado como um dos fatores de risco para a sua sustentabilidade. Por este motivo, no Programa de Gestão de RHS foram definidas, entre outras estratégias, as seguintes: i) melhoria na gestão e planeamento, ii) reforço de competências nas áreas de gestão e planeamento, iii) melhoria na distribuição e estabelecimento de RHS, iv) melhoria dos mecanismos e instrumentos de formação inicial e v) melhoria da formação contínua. Como fatores de risco que impeçam a prossecução dos objetivos do Programa aponta-se: o nível de incentivos, salários e condições de trabalho pouco atrativas.

Considerando que para qualquer Sistema de Saúde a qualidade dos cuidados é sustentada na definição do número e qualificação dos RHS, é importante investigar, de acordo com as estratégias, objetivos e metas recomendadas no PNDS de Angola: i) Que perfil de RHS é necessário? ii) Que condições de formação graduada e pós-graduada/continuada existem para satisfazer este perfil? iii) Quais são as características da gestão de RHS ao nível do serviço, tendo em conta o perfil, planeamento, administração e desenvolvimento do gestor? Para contribuir para o corpo de conhecimento necessário para responder a estas questões, está em curso um projeto de investigação, começando com o estudo exploratório aqui apresentado, cujo objetivo é descrever as perceções dos gestores de RHS das unidades de Saúde Primária da Província de Cabinda sobre as políticas de formação e retenção de RHS, tentando compreender se houve alguma evolução

Materials and Methods

To pursue the objective of this study, we opted for a cross-sectional observational study, based on semi-structured interviews supported by a survey containing closed and open questions, followed by a focus group. This questionnaire was applied during the month of May 2018, in a convenience sample of Principal Managers (General Directors), HRH managers of primary care units in Cabinda Province and managers from teaching schools. Health Units were selected in both the Urban, Suburban and Rural areas, thus allowing an image closer to the reality of the whole province of Cabinda. In this research, 10 Health Units were included for the interviews with professionals, representing about 9.8% of a total of 102 Health Units that make up the Public Health Service in Cabinda, namely one Urban Maternal-Child Centre, two Suburban Health Centers, and seven Municipal Hospitals between Rural (four), Urban (one) and Sub-Urban (two). In addition to these care units, managers from four teaching schools for health technicians (one Higher Polytechnic Institute, one School for the Training of Health Technicians, one College and one Faculty of Medicine) were interviewed. These institutions for training health technicians train professionals in different areas, in courses in medicine, nursing, laboratory, radiology, pharmacy and physiotherapy.

The questionnaire was divided into two parts. The first part aimed to identify the profile of the human resources in each center, from their qualification to the existing number and distribution among the different health units in the province. The second part aimed to identify perceptions about the quality of teaching, the quality of care provision, and the main opportunities for improvement identified by the unit managers.

Finally, a focus group with health services' managers of the province allowed the collection of more information to identify possible solutions to address the identified issues. The objective of this focus group was to analyze and comment on the results of the survey, aiming to identify a set of policies and measures that could contribute to improve health service provision and the training and retention of health professionals in Cabinda. A focus group script was developed, and moderators were instructed to seek consensus on the priority of problems and point out the paths to a solution. Notes were taken in writing and through audio recording with the informed consent of the participants.

The statistical analysis performed was purely descriptive, according to the objectives of the study,

significativa no triénio 2015-2018, a fim de produzir recomendações específicas para os decisores políticos.

Materiais e métodos

Para prosseguir o objetivo deste estudo, optámos por um estudo observacional transversal, baseado em entrevistas semiestruturadas apoiadas por um inquérito, contendo perguntas fechadas e abertas, a que se seguiu um grupo focal. O questionário foi aplicado durante o mês de Maio de 2018, numa amostra de conveniência de Diretores Principais (Diretores Gerais), gestores de RHS de unidades de cuidados primários na Província de Cabinda e gestores de escolas de ensino. As Unidades de Saúde foram selecionadas tanto nas zonas urbanas, suburbanas e rurais, permitindo assim uma imagem mais próxima da realidade de toda a província de Cabinda. Nesta investigação foram incluídas 10 Unidades de Saúde para as entrevistas com profissionais, representando cerca de 9,8% de um total de 102 Unidades de Saúde que constituem o Serviço de Saúde Pública em Cabinda, nomeadamente um Centro Materno-Infantil Urbano, dois Centros de Saúde Suburbanos, e sete Hospitais Municipais - Rurais (4), Urbano (1) e Suburbano (2). Para além dos gestores destas 10 unidades de cuidados, foram entrevistados gestores de 4 escolas de ensino para técnicos de saúde (1 Instituto Superior Politécnico, 1 Escola de Formação de Técnicos de Saúde, 1 Colégio e 1 Faculdade de Medicina). Estas instituições de formação de técnicos de saúde formam profissionais em diferentes áreas, em cursos de medicina, enfermagem, laboratório, radiologia, farmácia e fisioterapia.

O questionário foi dividido em 2 partes. A primeira parte, teve por objetivo identificar o perfil dos recursos humanos em cada centro, desde a sua qualificação até ao número existente e distribuição entre as diferentes unidades de saúde da província. Na segunda parte identificaram-se as perceções sobre a qualidade do ensino, a qualidade da prestação de cuidados, e as principais oportunidades de melhoria identificadas pelos gestores das unidades.

Finalmente, o grupo focal com os gestores dos serviços de saúde da província, permitiria recolher mais informações para identificar possíveis soluções para abordar as questões identificadas. O objetivo deste grupo focal foi analisar e comentar os resultados do inquérito, visando identificar um conjunto de políticas e medidas que pudessem contribuir para melhorar a prestação de serviços de saúde, a formação e retenção

Table 2 - Distribution of respondents according to their category and gender.**Tabela 2** - Distribuição dos inquiridos de acordo com a sua categoria e género.

Category	Total % (n)	Male / Homem % (n)	Female / Mulher % (n)	Mean Age (SD) / Média Idade (SD)
Health Unit Manager / Gestor da Unidade de Saúde	58.8 (10)	70.0 (7)	30.0 (3)	45.5 (7.7)
Health Unit Administrator / Administrador da Unidade de Saúde	17.6 (3)	33.3 (1)	66.7 (2)	46.7 (9.9)
School Manager Training / Gestor de Escola de Formação	23.5 (4)	25.0 (1)	75.0 (3)	53.5 (9.3)
Total	100.00 (17)	52.9 (9)	47.1 (8)	

and performed in SPSS v.22. All professionals signed an informed consent document, where they authorized the anonymous collection of their data only for the purposes of this research work.

Results

Seventeen individuals have completed the survey. Most of them were Health unit managers (Table 2). The individuals' ages varied between 33 and 66 years old. Training school managers had the highest mean age (53.5), compared with the other professionals.

From managers' own data collection in the ten health units, it was possible to ascertain that there were 551 qualified technicians (Table 3). Approximately 30 % of all HRH were allocated to 1st of May Hospital, which also serves as the main maternity hospital in Cabinda. Most of the HRH were nurses, with a total of 420 nurses from various specialties (76.2% of the total professionals), 82 Laboratory and X-ray technicians, and 49 physicians, in a ratio of 8.6 nurses for each physician. Regarding the training offer (Table 4), the four training schools participating in the study trained approximately 746 senior and middle level technicians in the previous year. The majority were from nursing courses (60.3%), followed by the laboratory course of Clinical Analysis/Laboratory Technicians with 120 technicians (16%), the physician's course with 56 (7.5%) trained and, finally, the radiology, pharmacy and physiotherapy courses that trained 40 (5.3%) technicians each, respectively. No postgraduate programs directed at these professionals were mentioned. Among the six existing courses, administered in the different training units, four work with the respective academic curricula and the remaining two do not. This means that the courses are administered without a curricular structure defined by law, depending on the experience of the professor.

de profissionais de saúde em Cabinda. Foi desenvolvido um guião para o grupo focal, e os moderadores foram instruídos a procurar um consenso sobre a prioridade dos problemas e a apontar os caminhos para uma solução. Foram tomadas notas por escrito e através de gravação áudio com o consentimento informado dos participantes.

A análise estatística realizada foi puramente descritiva, de acordo com os objetivos do estudo, e realizada no SPSS v.22. Todos os profissionais assinaram um documento de consentimento informado, onde autorizam a recolha anónima dos seus dados apenas para os fins deste trabalho de investigação.

Resultados

Um total de 17 indivíduos completaram o inquérito. A maioria deles eram gestores de unidades de saúde (Tabela 2). Os indivíduos tinham idades compreendidas entre os 33 e 66 anos. Os gestores das escolas de formação tinham a idade média mais elevada (53,5 anos), em comparação com os outros profissionais.

A partir da recolha de dados dos próprios gestores nas 10 unidades de saúde, foi possível verificar que havia um total de 551 técnicos qualificados (Tabela 3). Aproximadamente 30% de todos os RHH foram atribuídos ao Hospital 1º de Maio, que funciona também como a principal maternidade em Cabinda. A maioria dos RHH eram enfermeiros, com um total de 420 enfermeiros de várias especialidades (76,2% do total de profissionais), 82 técnicos de laboratório e de raios X, e 49 médicos, numa proporção de 8,6 enfermeiros para cada médico. Relativamente à oferta de formação (Tabela 4), as 4 escolas de formação que participaram no estudo formaram no ano anterior cerca de 746 técnicos de nível superior e médio. A maioria foi proveniente de cursos de enfermagem (60,3%), seguida pelo curso laboratorial de Técnicos de Análises Clínicas/Técnicos de Laboratório com 120 técnicos (16%), o curso de médicos com 56 (7,5%) formados

Table 3 - Distribution of HRH by health units as reported by the units' managers.

Tabela 3 - Distribuição de RHS pelas unidades de saúde, tal como relatado pelos gestores das unidades.

Health Units / Unidades de Saúde	Available Human Resources for Health (HRH) / Disponibilidade de RHS				Total	%
	Physicians / Médicos	Nurses / Enfermeiros	Laboratory Technicians / Técnicos de Laboratório	RX Technicians / Técnicos de RX		
Hospital 1 st May * / Hospital 1 ^o de Maio *	20	128	14	2	164	29.8
Cabinda Municipal Hospital (Chinga) / Hospital Municipal de Cabinda (Chinga)	5	49	6	3	63	11.4
Hospital 28 th August** / Hospital 28 de Agosto***	11	38	7	6	62	11.3
Cabinda Maternal and Child Center / Centro Materno-Infantil de Cabinda	2	35	5	5	47	8.5
Sta Catarina Infectious-Contagious Hospital *** / Hospital Infecto-Contagioso de Sta Catarina ***	6	33	3	5	47	8.5
Chiweca Health Center / Centro de Saúde de Chiweca	1	33	5	0	39	7.1
Municipal Hospital Belize / Hospital Municipal Belize	1	30	3	3	37	6.7
Buco Zau Municipal Hospital / Hospital Municipal de Buco Zau	1	27	3	1	32	5.8
Tchizo Health Center / Centro de Saúde Tchizo	1	25	4	1	31	5.6
Hospital Alzira da Fonseca / Hospital Alzira da Fonseca	1	22	4	2	29	5.3
Total	49	420	54	28	551	100.0

* Functions as the Main Maternity Hospital in Cabinda / Funciona como a Maternidade Principal do Hospital de Cabinda

** Unit with provincial reference diagnostic and therapeutic examination skills, especially in the specialty of Cardiology and Physiotherapy /

Unidade com competências de diagnóstico e exame terapêutico de referência provincial, especialmente na especialidade de Cardiologia e Fisioterapia

*** Provincial reference infectious disease treatment unit / Unidade de referência provincial de tratamento de doenças infecciosas

Table 4 - Quantity and quality of training provision in the different areas of knowledge.

Tabela 4 - Quantidade e qualidade da oferta de formação nas diferentes áreas de conhecimento.

Designation / Designação	Average Graduated / Year (n) Média de Graduados / Ano (n)	Existence of course curriculum / Existe currículo para o curso	
		Yes / Sim	No / Não
Training of Physicians / Formação de Médicos	56	1	0
Training of Nurses / Formação de enfermeiros	450	3	0
Training of Laboratory Technicians / Formação de Técnicos de Laboratório	120	1	1
Training of Imaging Technicians / Formação de Técnicos de Imagiologia	40	0	1
Training of Pharmacy Technician / Formação de Técnico de Farmácia	40	0	1
Training of Physiotherapy Technicians / Formação de Técnicos de Fisioterapia	40	0	1
Total Trainees / Total de formandos	746	5	4

In total, of the 13 health unit managers, eight (61.5%) individuals had an academic degree, three (23.1%) were post-graduate technicians in management and two (15.4%) did not mention their training. It is important to highlight that no respondent with functions that include HRH management had specific training for this purpose. As for satisfaction with the working conditions and professional career development of the manager of the healthcare unit, two (15.4%) managers reported being satisfied and 11 (84.6%) showed dissatisfaction.

e, finalmente, os cursos de imagiologia, farmácia e fisioterapia que formaram 40 (5,3%) técnicos cada um, respetivamente. Não foram mencionados programas de pós-graduação dirigidos a estes profissionais. Entre os 6 cursos existentes, administrados nas diferentes unidades de formação, quatro trabalham com os respetivos currículos académicos e os dois restantes não. Isto significa que os cursos são administrados sem uma estrutura curricular definida por lei, dependendo da experiência do professor.

Regarding the HRH managements processes, only three (23.1%) managers confirmed the existence of an HRH planning document in their institution. Likewise, it was found that five (38.5%) of the managers knew of the existence of a Continuous Training Plan in the institution and the other eight (61.5%) were unaware of its existence.

During the survey, in which the Questionnaire was administered individually to each participant and completed face-to-face, a space for "Comment" after the final answer about what improvements he or she would introduce in the functioning of the unit was not filled by most respondents but allowed the collection of three spontaneous statements, transcribed (and translated) below:

"... in relation to training courses, several courses do not have elaborated and approved curricula. Each teacher administers classes according to their criteria. As for practical training in care units, there is little availability of technical and human conditions to guarantee quality training."

F1, 44 years, Manager, Educational Institution

"... we have a training program defined at a higher level (Cuban model) and that is why we have mainly Cuban teachers. They administer theoretical classes at the Faculty, but do not accompany students in the practical training, either in the preventive area or in the hospital area. (...) We have already suggested to the Ministry of Higher Education, Science, Technology and Innovation, for the revision of the curricula of the courses and the integration of Angolan teachers and teacher training for nationals in order to overcome these gaps."

F2, 54 years, Manager, Educational Institution

"... At the hospital, we do not have the technical and material conditions for teaching. Students come for training, but there is no good coordination between the school and the hospital, so that students are more on the schedule than they actually learn. And this phenomenon

No total, dos 13 gestores de Unidades de Saúde, 8 (61,5%) indivíduos têm um grau acadêmico, 3 (23,1%) são técnicos pós-graduados em gestão e 2 (15,4%) não mencionaram a sua formação. É importante salientar que nenhum respondente com funções que incluem gestão de RHS tem formação específica para este fim. Quanto à satisfação com as condições de trabalho e desenvolvimento da carreira profissional do gestor da unidade de saúde, 2 (15,4%) gestores referiram estar satisfeitos e 11 (84,6%) demonstraram insatisfação. Relativamente aos processos de gestão de RHS, apenas 3 (23,1%) gestores confirmaram a existência de um documento de planeamento de RHS na sua instituição. Do mesmo modo, verificou-se que 5 (38,5%) dos gestores sabem da existência de um Plano de Formação Contínua na instituição e os outros 8 (61,5%) não têm conhecimento da sua existência.

Durante o inquérito, no qual o Questionário foi administrado individualmente a cada participante, para ser preenchido pessoalmente, um espaço para "Comentário" após a resposta final sobre as melhorias que introduziria no funcionamento da unidade, não foi preenchido pela maioria dos inquiridos, mas permitiu a recolha de três declarações espontâneas, transcritas abaixo:

"... em relação aos cursos de formação, vários cursos não têm currículos elaborados e aprovados. Cada professor administra as aulas de acordo com os seus critérios. Quanto à formação prática em unidades de cuidados, há pouca disponibilidade de condições técnicas e humanas para garantir uma formação de qualidade."

F1, 44 anos, Gestor, Instituição de Ensino

"... temos um programa de formação definido a um nível superior (modelo cubano) e é por isso que temos principalmente professores cubanos. Eles administram aulas teóricas na Faculdade, mas não acompanham os alunos na formação prática, quer na área preventiva, quer na área hospitalar. (...) Já sugerimos ao Ministério do Ensino Superior, Ciência, Tecnologia e Inovação, a revisão dos currículos dos cursos e a integração de professores angolanos e a formação de professores para os nacionais, a fim de ultrapassar estas lacunas."

F2, 54 anos, Gestor, Instituição de Ensino

"... No hospital, não temos as condições técnicas e materiais para o ensino. Os estudantes vêm para formação, mas não há uma boa coordenação entre a escola e o hospital, de modo que os estudantes estão mais dentro do horário do que realmente aprendem. E

is reflected in their performance, once integrated into the exercise of their profession."

- M1, 48 years, Health Unit Manager

To discuss the survey results, all the 13 managers were invited for the focus group. The focus group addressed the main difficulties managers faced in their daily work to fulfil their activities and contribute to the HRH managing. Two main questions were put to the discussion: "What difficulties do you feel that protract the normal operation of the health unit?" and "What improvements would you make/need to the operation of the health unit?" Among the managers, there were some disagreements on which difficulties were more important. For a HRH manager, the most important difficulties were the "lack of a strategic plan, with clear goals and objectives in terms of health policies" and "Information systems with non-updated records." For a health unit manager, the more important barriers to improve the quality of services were "Health professionals' lack of interest in knowing their performance," the "Bureaucratic procedures that slow down the decision-making process" and "Health professionals with long and accommodating careers." HR managers seem to give less importance to the excess of useless activities than the health unit managers.

To improve the function of the health care units, the managers pointed out as measures to be implemented: i) the approval of the staffing plans; ii) implementation of electronic health databases; iii) increasing the HRH salaries; iv) improvement in clinical communication; v) medication management; vi) budget improvements and vii) rehabilitation and recovery of existing facilities and equipment. Focus group participants reflected on these findings and grouped them into two main components of action for future strategic plans:

Component 1 "Leadership empowerment" - reflecting the need for managers to be empowered, both in terms of knowledge and support from the central administration (Ministry of Health)

Component 2 "Improving information system efficiency" - which reflects managers' perception of the impact of inefficient information systems on HR workload and on management quality.

Finally, the focus group proposed that the results of the discussion and the solution proposals should be analyzed in the Provincial Secretariat and, once validated, sent to the Government of Cabinda Province and the Ministry of Health, Ministry of Higher Education, Science, Technology and Innovation and

este fenómeno reflete-se no seu desempenho, uma vez integrado no exercício da sua profissão".

M1, 48 anos, Gestor da Unidade de Saúde

Para discutir os resultados do inquérito, todos os gestores foram convidados e participaram no grupo focal. O grupo focal abordou as principais dificuldades enfrentadas pelos gestores no seu trabalho diário para realizarem as suas atividades e contribuir para a gestão dos RHS. Foram colocadas duas questões principais à discussão: "Que dificuldades sentem que prolongam o funcionamento normal da unidade de saúde?" e "Que melhorias fariam/necessitam ao funcionamento da unidade de saúde?". Houve algumas discordâncias sobre quais as dificuldades mais importantes, dependendo do papel que cada gestor tinha. Para um gestor de RHS, as dificuldades mais importantes eram a "falta de um plano estratégico, com metas e objetivos claros em termos de políticas de saúde" e "Sistemas de informação com registos não atualizados". Para um gestor de unidade de saúde, as barreiras mais importantes para melhorar a qualidade dos serviços eram a "falta de interesse dos profissionais de saúde em conhecer o seu desempenho", "os procedimentos burocráticos que atrasam o processo de tomada de decisões" e os "profissionais de saúde com carreiras longas e acomodadas". Os gestores de RHS parecem dar menos importância ao excesso de atividades inúteis do que o gestor da unidade de saúde.

Para melhorar o funcionamento das unidades de saúde, os gestores apontaram como medidas a serem implementadas: i) a aprovação dos planos de pessoal; ii) a implementação de bases de dados de saúde eletrónicas; iii) o aumento dos salários dos RHS; iv) a melhoria da comunicação clínica; v) a gestão de medicamentos; vi) as melhorias orçamentais e vii) a reabilitação e recuperação das instalações e equipamentos existentes. Os participantes dos grupos focais refletiram sobre estas conclusões e agruparam-nas em dois componentes principais de ação para planos estratégicos futuros:

Componente 1 "Empoderamento da liderança" - refletindo a necessidade de empoderamento dos gestores, tanto em termos de conhecimento como de apoio da administração central (Ministério da Saúde)

Componente 2 "Melhoria da eficiência do sistema de informação" - que reflete a perceção dos gestores sobre o impacto dos sistemas de informação ineficientes na carga de trabalho de RHS e na qualidade da gestão.

Finalmente, o grupo focal propôs que os resultados da discussão e as propostas de solução fossem analisados na Secretaria Provincial e uma vez validados, enviados

the Ministry of Education of Angola. After central approval, participants referred that there should be a follow-up of the planning, implementation, monitoring, and evaluation of the proposed solutions that may result in improved quality of health indicators in Cabinda Province and perhaps in the country as a whole.

Discussion

This exploratory study presents relevant data on the characterization and distribution of health professionals and managers of health units in the province of Cabinda.

Considering the distribution of health professionals, there is still a great concentration on the urban area of the province of Cabinda and on central hospitals. This observation, although not new, shows that the policies implemented to improve the distribution of professionals across the territory still have a long way to go to be considered successful. Oliveira and Artmann (20) had already identified in March 2009 the number of physicians in rural areas in Cabinda Province, with some areas with a ratio of 1 physician / + 3000 inhabitants and other locations of more than 35,000 inhabitants without medical coverage. In 2014, the province had only 47 Angolan national physicians working in public health services (18). In urban areas, covering 86.9% of the population (21), there were approximately 79% of these physicians, with the remaining 21% distributed in rural municipalities, most of them occupying management functions in health units. The same situation also occurred at the national level: in 2011, about 42% of physicians were concentrated in the country's capital Luanda, with only 24% of the total population of Angola. This urban concentration effect is also seen with other provincial capitals which concentrate around 85% of the physicians' workforce (13). In the study published by Macaia and Lapão (15), the authors considered that this concentration shows a balance in HRH policies that, according to the authors, can be understood as a result of a centralized recruitment process that allocates HRH to all health units (via the Provincial HRH Department), as well as due to wages that are not differentiated in terms of geographic location. In addition to the high concentration of physicians in the cities, the high nurses/physicians ratio found (8.6 nurses:1 physician), reflects the lack of trained physicians that is typical in the WHO African region (22). The need to increase the training of physicians and incentives for them to work in rural areas must remain a priority in the Angolan health system.

ao Governo da Província de Cabinda e ao Ministério da Saúde, Ministério do Ensino Superior, Ciência, Tecnologia e Inovação e ao Ministério da Educação de Angola. Após aprovação central, os participantes referiram que deveria haver um acompanhamento do planeamento, implementação, monitorização e avaliação das soluções propostas, o que poderia resultar numa melhoria da qualidade dos indicadores de saúde na Província de Cabinda e talvez no país como um todo.

Discussão

Este estudo exploratório apresenta dados relevantes sobre a caracterização e distribuição de profissionais de saúde e gestores de unidades de saúde na província de Cabinda.

Considerando a distribuição dos profissionais de saúde, há ainda uma grande concentração na área urbana da província de Cabinda e nos hospitais centrais. Esta observação, embora não seja nova, mostra que as políticas implementadas para melhorar a distribuição dos profissionais em todo o território têm ainda um longo caminho a percorrer para serem consideradas bem-sucedidas. Oliveira e Artmann (20), já tinham identificado em março de 2009 o número de médicos nas zonas rurais da província de Cabinda, com algumas zonas com uma proporção de 1 médico / + 3000 habitantes e outros locais com mais de 35.000 habitantes sem cobertura médica. Em 2014, a província tinha apenas 47 médicos nacionais angolanos a trabalhar nos serviços de saúde pública (18). Nas zonas urbanas, cobrindo 86,9% da população (21), havia aproximadamente 79% destes médicos, com os restantes 21% distribuídos em municípios rurais, a maioria deles ocupando funções de gestão em unidades de saúde. A mesma situação ocorreu também a nível nacional: em 2011, cerca de 42% dos médicos estavam concentrados na capital do país, Luanda, com apenas 24% da população total de Angola. Este efeito de concentração urbana verifica-se também com outras capitais provinciais que concentram cerca de 85% da força de trabalho dos médicos (13). No estudo publicado por Macaia e Lapão (15), os autores consideram que isto mostra um equilíbrio nas políticas de RHS que, segundo os autores, pode ser entendido como resultado de um processo de recrutamento centralizado (através do Departamento Provincial de RHS) para serviços públicos que atribuem RHS a todas as unidades de saúde, bem como salários que não são diferenciados em termos de localização geográfica. Para além da elevada concentração de médicos nas cidades, o elevado rácio enfermeiros/médicos encontrados

If we consider primary health care the basis for the provision of health services and the main route of access to the health system, the professional/inhabitants deficit ratio can be a critical point for materializing the Municipalization of Services strategy. It should be noted that the estimated population that these studied units serve is around 801,374, and some units, despite being located in the main city (Cabinda), due to their specificity, meet a provincial demand (Ex. Tuberculosis, HIV / AIDS, Physiotherapy, Technical Exams Cardiology). Thus, it is complex to define the proportion of care needs in urban/suburban and rural areas.

Regarding the training offer, the training schools trained about 746 senior and middle technicians in one year (referring to 2017). These figures reveal the local capacity to carry out initial training at both the middle and higher levels is installed. However, healthcare units managers emphasize the lack of technical and technological resources, deficient tutorial teaching, and weak knowledge of theoretical and practical concepts. These deficits are evidenced by those who work in units and also, by the managers of training units, regarding the curricular quality of the courses, teacher profile, teaching support in the practical field and rigor in the evaluation of students. All these findings reflect the published evidence (4), which means that few steps have been taken or that the implemented measures have not been successful.

In the management of health care units, only three (23.1%) managers confirmed the existence of an HRH planning document. The deficit in the training of these managers may be the basis for not creating management tools and improving results. In addition, the vast majority (84.6%) are dissatisfied with working conditions. This factor can be an impediment to the good performance of the management and of the professional development of HRH. Moreover, organizational management shortcomings are still dramatically constrained by resource shortages including high absenteeism rates, lack of data recording support, and non-existent core competencies.

To improve the function of their care units, the managers point out several measures to be implemented: the approval of minimal staff requirements, increase in HRH salaries, improvement in clinical communication and medication management, budget improvements and rehabilitation and recovery of existing facilities and equipment. It should be noted that three of the main schools for the training of health professionals (HP), namely the Faculty of Medicine, the Polytechnic

(8,6 enfermeiros:1médico), reflete a falta de médicos formados que é típica na região africana da OMS (22). A necessidade de aumentar a formação dos médicos e os incentivos para trabalharem nas zonas rurais deve continuar a ser uma prioridade no sistema de saúde angolano.

Se considerarmos os cuidados de saúde primários a base para a prestação de serviços de saúde e a principal via de acesso ao sistema de saúde, o rácio défice profissional/habitante pode ser um ponto crítico para a materialização da estratégia de Municipalização de Serviços. Note-se que a população estimada que estas unidades estudadas servem é de cerca de 801.374 pessoas, e algumas unidades, apesar de estarem localizadas na cidade principal (Cabinda), devido à sua especificidade, satisfazem uma procura provincial (Ex. Tuberculose, VIH/SIDA, Fisioterapia, Cardiologia de Exames Técnicos). Assim, é complexo definir a proporção de necessidades de cuidados em áreas urbanas/suburbanas e rurais.

Relativamente à oferta de formação, as escolas de formação formaram cerca de 746 técnicos superiores e médios num ano (referentes a 2017). Estes números revelam que localmente existe capacidade instalada para realizar a formação inicial tanto a nível médio como superior. No entanto, os gestores das unidades de saúde salientam a falta de recursos técnicos e tecnológicos, o deficiente ensino tutorial e o fraco conhecimento dos conceitos teóricos e práticos, evidenciado por aqueles que trabalham em unidades e também, pelos gestores das unidades de formação, relativamente à qualidade curricular dos cursos, perfil do professor, apoio pedagógico no campo prático e rigor na avaliação dos alunos. Todos estes resultados refletem o que já foi publicado (4), o que significa que poucos passos foram dados ou que as medidas implementadas não foram bem-sucedidas.

Na gestão das unidades de saúde, apenas 3 (23,1%) gestores confirmaram a existência de um documento de planeamento de RHS. O défice na formação destes gestores pode ser a base para não criar ferramentas de gestão e melhorar os resultados. Além disso, a grande maioria (84,6%) está insatisfeita com as condições de trabalho. Este fator pode ser um impedimento ao bom desempenho da gestão e do desenvolvimento profissional dos RHS. E as carências de gestão organizacional são ainda dramaticamente condicionadas pela carência de recursos incluindo alta taxa de absentismo, ausência de suporte de registo de dados e competências essenciais não existentes. Para melhorar o funcionamento das unidades de cuidados onde estão

Institute of the Universidade 11 de Novembro and the School for the Training of Health Technicians, are relatively young (less than 10 years old). Hence, the “rehabilitation of the facilities” measure may not apply to these institutions. However, it is known that at least 50% of medical equipment in developing countries is totally or partially inoperable, for various reasons (23,24). This “facility rehabilitation” measure may thus reflect the need for better laboratory equipment and its maintenance. As health cannot be dissociated from the need for maintenance of diagnostic equipment, a priority intervention should also be the training of technicians to maintain this equipment in parallel with health technicians who will operate them.

This study is another contribution to support health policy-making in Angola. Of the 46 countries in the WHO African Region, 36 were considered to be HRH crisis countries. Of these, 10, including Angola, were considered to have a critical HRH deficit; 24 had no national HRH policy; 34 had no strategic plan for their HRH; and 35 had no HRH observatory. The Luanda Resolution left member states with the challenge of approving their HRH policies and strategies by 2014 (9). In Angola, the most recent National Health Development Plan 2012-2025 (PNDS), a long-term strategic-operational instrument (10), is intended to materialize the guidelines set forth in the “Angola 2025” Development Strategy and the National Health Policy, within the framework of the National Health System reform. However, despite the work done over the last decade, the Angolan government recognizes that the main constraints in the area of human resources still exist. These include the serious lack of information for managing and administering the health workforce at all levels, workplaces where, due to their geographic location or isolation, it is difficult to locate health technicians and a strong dependence on expatriate technicians, particularly for specialized cadres. This implies an urgent need to know how many HRH exist, where they are, what they do and how they do it. It is not unconnected to these constraints that the amount of the Angolan State Budget allocated to the health sector is 5.65% of GDP (25), still far from the 15% established as a goal in the commitment of the African Union Heads of State Declaration in Abuja (7).

localizadas, os gestores apontam como medidas a serem implementadas: a aprovação de requisitos mínimos de pessoal, aumento dos salários de RHS, melhoria da comunicação clínica e gestão de medicamentos, melhorias orçamentais e reabilitação e recuperação das instalações e equipamento existentes. É de notar que três das principais escolas para a formação de profissionais de saúde (HP), nomeadamente a Faculdade de Medicina, o Instituto Politécnico da Universidade 11 de Novembro e a Escola de Formação de Técnicos de Saúde, são relativamente novas (menos de 10 anos), daí que a medida de “reabilitação das instalações” possa não se aplicar a estas instituições. No entanto, sabe-se que pelo menos 50% do equipamento médico nos países em desenvolvimento é total ou parcialmente inoperante, por várias razões (23,24). Esta medida de “reabilitação das instalações” pode, assim, refletir a necessidade de melhor equipamento de laboratório e respetiva manutenção. E porque a saúde não pode ser dissociada desta necessidade da manutenção de equipamentos de diagnóstico, uma intervenção prioritária deverá ser a formação de técnicos de manutenção desses equipamentos em paralelo com os técnicos de saúde que os operam.

O presente estudo é mais um contributo para o suporte à definição da política de saúde em Angola. Dos 46 países na Região Africana da OMS, 36 foram considerados como países em crise de RHS. Destes, dez, incluindo Angola, como Estados com um défice crítico de RHS; 24 não tinham uma política nacional de RHS; 34 não tinham um plano estratégico para os seus RHS; e 35 não tinham um observatório de RHS. A Resolução de Luanda deixou aos Estados Membros o desafio de aprovarem as suas políticas e estratégias de RHS até 2014 (9). Em Angola, o mais recente Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário 2012-2025 (PNDS), um instrumento estratégico-operacional de longo prazo, (10), destina-se à materialização das orientações fixadas na Estratégia de Desenvolvimento “Angola 2025” e na Política Nacional de Saúde, no âmbito da reforma do Sistema Nacional de Saúde. Contudo, e apesar do trabalho desenvolvido na última década, é ainda reconhecido pelo governo angolano que os principais constrangimentos no âmbito de Recursos humanos ainda se mantém, entre eles o grave défice de informação para gestão e administração da força de trabalho da saúde a todos os níveis, postos de trabalhos em que pela sua situação geográfica ou por condições de isolamento é difícil fixar técnicos de saúde e forte dependência de técnicos expatriados, particularmente para os quadros especializados. o que implica necessidade urgente de se saber quantos RH existem, onde estão, o que fazem e

In their inferential study, Macaia and Lapão (15) considered that there was a balance in HRH policies. This balance could be understood as a result of the centralized recruitment process (through the Provincial HRH Department) for the public services that assign HRH to all health facilities, as well as the salaries, that were not differentiated in terms of geographic location. Moreover, according to these authors' findings, this reality needs to be better understood and policies need to be defined to address it. As we can see with the present study, this balance is not yet settled. The processes of erosion and non-fixation of HRH continue, in good part not for lack of policies, but due to the lack of implementation of policies already defined in the law. One example is the lack of implementation of Presidential Decree 260/10 (26), which approves the Legal Regime of Hospital Management defining the rules of structuring, coordination, organization and operation of central hospitals, general hospitals, municipal hospitals and special establishments and services throughout the Angolan territory.

Evidence of the need to implement Human resources management practices in Sub-Saharan African countries to mitigate the impact of an inadequate health workforce on the burden of disease is long-standing (27). However, the solutions are not always linear and the importance of context must be underlined (28). In the context of Cabinda, the geographical location and the distance to the central government in Luanda may contribute to the lack of developments in the last years. Moreover, human resources managers in Cabinda, besides the lack of institutional support they mention that is rooted in their context, seem to emphasize the need to update the information systems, both clinical and managerial, to increase their efficiency. Health information systems (HIS) are one of the six essential blocks of and health system (29). Our findings support the belief that little has been done in strengthening this aspect of the Angolan health system, although its importance is recognized in the latest national health plan (10). However, the focus of current HIS has been on epidemiological surveillance. It is therefore suggested that more importance should be placed in the implementation of appropriate health information systems with the necessary training of human resources managers, specifically focused on managerial duties and quality improvement, in future national health plans.

como fazem. A estes constrangimentos não será alheio o facto de a verba do Orçamento de estado angolano atribuído ao Sector da saúde ser de 5,65% do PIB (25), ainda longe dos 15% estabelecidos como meta no compromisso da Declaração dos Chefes de Estado da União Africana, em Abuja (7).

No seu estudo inferencial, Macaia e Lapão (15) consideraram que havia um equilíbrio nas políticas de RHS. Este equilíbrio podia ser compreendido como resultado do processo de recrutamento centralizado (através do Departamento Provincial de RHS) para os serviços públicos que atribuem RHS a todas as unidades de saúde, bem como dos salários que não eram diferenciados em termos de localização geográfica. Além disso, de acordo com as conclusões dos autores, esta realidade precisa de ser melhor compreendida e é necessário definir políticas para a enfrentar. Como podemos constatar, este equilíbrio ainda não está sedimentado. Os processos de erosão e não fixação de RHS continuam, em boa parte não por falta de políticas, mas por falta de implementação de políticas já definidas em decreto-lei. Um exemplo é falta de aplicação do Decreto Presidencial 260/10 (26), que aprova o Regime Jurídico de Gestão Hospitalar definindo as regras de estruturação, coordenação, organização e funcionamento dos hospitais centrais, hospitais gerais, hospitais municipais e dos estabelecimentos e serviços especiais, em todo o território angolano.

A necessidade de implementar práticas de gestão de recursos humanos nos países da África Subsaariana para mitigar o impacto de uma inadequada força de trabalho em Saúde sobre o peso da doença é uma evidência de longa data (27). No entanto, as soluções nem sempre são lineares e a importância do contexto deve ser sublinhada (28). No contexto de Cabinda, a localização geográfica e a distância até ao governo central em Luanda pode contribuir para a falta de desenvolvimentos nos últimos anos. Além disso, os gestores de recursos humanos em Cabinda, para além da falta de apoio institucional que mencionam e que está enraizado no seu contexto, parecem enfatizar a necessidade de atualizar os sistemas de informação, tanto clínicos como de gestão, para aumentar a sua eficiência. Os sistemas de informação sanitária (HIS) são um dos seis blocos essenciais do sistema de saúde (29). Os resultados aqui apresentados apoiam a crença de que pouco foi feito para reforçar este aspeto do sistema de saúde angolano, embora a sua importância seja reconhecida no último plano nacional de saúde (10). No entanto, no plano atual, o foco dos HIS tem sido a vigilância epidemiológica. Sugere-se, portanto,

This work has some limitations that should be acknowledged. The choice of a convenience sample of managers may have biased the sample towards people more willing to participate and partake in some form of discussion that, in their perspective, could influence policy makers to intervene. This could be avoided by selecting a random sample among the 109 health units, but we considered this option unfeasible. In addition, other methodologies such as a Delphi panel with key opinion leaders selected in the province of Cabinda could have been used to perform this study. Nevertheless, we consider that our choice was the most feasible and the least prone to bias possible in the current context.

Conclusion

This study affirms that health units' managers have little institutional support to define policies for human resources for health, as evidenced by the absence of a development plan for human resources. Improving the information systems and communication between central planners and provincial authorities seems to be a priority. There is a valuable mission commitment although managers with specific training do not prevail; for this reason, the deficit in the creation of management tools, both strategic and operational, can be justified, with emphasis on staff and adequate staff planning due to lack of knowledge of organic needs and their deficits, continuous training plans for the training of employees, and consequent career development. Therefore, we believe more focused studies are needed to identify restraining and facilitator factors that may contribute to the improvement of HRH managers' skills and teaching quality of health professionals in general within Cabinda province.

que seja dada maior importância à implementação de adequados sistemas de informação dedicados à gestão, com a necessária formação de gestores de recursos humanos, especificamente centrada em funções de gestão e melhoria da qualidade, nos futuros planos nacionais de saúde.

Este trabalho tem algumas limitações que devem ser reconhecidas. A escolha de uma amostra de conveniência de gestores pode ter distorcido a amostra em favor de pessoas mais dispostas a participar e a contribuir em alguma forma de discussão que poderia, na sua perspectiva, influenciar os decisores políticos a intervir. Isto poderia ser evitado selecionando uma amostra aleatória entre as 109 unidades de saúde, mas considerámos esta opção impraticável. Além disso, outras metodologias, tais como um painel Delphi com líderes de opinião selecionados na província de Cabinda, poderiam ter sido utilizadas para realizar este estudo. No entanto, consideramos que a nossa escolha foi a mais viável e a menos sujeita a vieses no contexto actual.

Conclusão

Considerando os resultados deste estudo, pode afirmar-se que os gestores das unidades de saúde têm pouco apoio institucional para definir políticas de recursos humanos para a saúde, como evidenciado pela ausência de um plano de desenvolvimento de recursos humanos. A melhoria dos sistemas de informação e comunicação entre os planificadores centrais e as autoridades provinciais parece ser uma prioridade. Existe um compromisso de missão valioso, apesar do facto de os gestores com formação específica não prevalecerem; por esta razão, o défice na criação de instrumentos de gestão, tanto estratégicos como operacionais, pode ser justificado, com ênfase no pessoal e no planeamento adequado do pessoal devido à falta de conhecimento das necessidades orgânicas e dos seus défices, planos de formação contínua para a formação dos funcionários, e consequente desenvolvimento de carreira. Por conseguinte, acreditamos que são necessários estudos mais focalizados para identificar fatores de impedimento e facilitadores que possam contribuir para a melhoria das competências dos gestores de RHS e da qualidade de ensino dos profissionais de saúde em geral, na província de Cabinda.

Authors Contributions Statement

MC and JG, conceptualization and study design; TM and AM, experimental implementation; TM, AM, MC, and JG, data analysis; TM, MC and JG, drafting, editing and reviewing; TM, tables; MC and JG, supervision and final writing.

Funding

This study was 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

Acknowledgments

We express our thanks to the institutions: University Lusófona for hosting the research project that resulted in this study; Cabinda Provincial Government for the authorization to conduct research in its administrative jurisdiction; to the heads of the health units targeted for research at the level of the Cabinda Province; to University 11 de Novembro in Cabinda, for their collaboration on the research project underlying this work.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no relationship of potential conflict of interest.

Declaração de contribuição dos autores

MC e JG, conceptualização e conceção do estudo; TM e AM, implementação experimental; TM, AM, MC e JG, análise de dados; TM, MC e JG, redação, edição e revisão; TM, tabelas; MC e JG, supervisão e redação final.

Financiamento

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

Agradecimentos

Expressamos os nossos agradecimentos às instituições: Universidade Lusófona pelo acolhimento do projeto de investigação de que resultou o presente estudo; Governo Provincial de Cabinda pela autorização de realização da pesquisa na sua jurisdição administrativa; aos responsáveis das unidades sanitárias alvos da pesquisa a nível da Província de Cabinda; à Universidade Onze de Novembro em Cabinda, pela colaboração no projeto de investigação subjacente a este trabalho.

Conflitos de Interesses

Os autores declaram que não tem qualquer relação de potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Mullan, F., Frehywot, S., Omaswa, F., Sewankambo, N., Talib, Z., Chen, C., Kiarie, J., & Kiguli-Malwadde, E. (2012). The Medical Education Partnership Initiative: PEPFAR's Effort To Boost Health Worker Education To Strengthen Health Systems. *Health Affairs*, 31(7), 1561–1572. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2012.0219>
2. Chen, C., Buch, E., Wassermann, T., Frehywot, S., Mullan, F., Omaswa, F., Greysen, S. R., Kolars, J. C., Dovlo, D., El Gali Abu Bakr, D. E., Haileamlak, A., Koumare, A. K., & Olapade-Olaopa, E. O. (2012). A survey of Sub-Saharan African medical schools. *Human Resources for Health*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1478-4491-10-4>
3. Mullan, F., Frehywot, S., Omaswa, F., Buch, E., Chen, C., Greysen, S. R., Wassermann, T., ElDin ElGaili Abubakr, D., Awases, M., Boelen, C., Diomande, M. J.-M. I., Dovlo, D., Ferro, J., Haileamlak, A., Iputo, J., Jacobs, M., Koumaré, A. K., Mipando, M., Monekosso, G. L., ... Neusy, A.-J. (2011). Medical schools in sub-Saharan Africa. *The Lancet*, 377(9771), 1113–1121. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61961-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61961-7)
4. Fronteira, I., Sidat, M., Fresta, M., Sambo, M. do R., Belo, C., Kahuli, C., Rodrigues, M. A., & Ferrinho, P. (2014). The rise of medical training in Portuguese speaking African countries. *Human Resources for Health*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1478-4491-12-63>
5. WHO. (2009). *Resolution WHA59.23 on rapid scaling up of health workforce production, 2006; Resolution WHA59.27 Strengthening Nursing and Midwifery, 2006*. WHO Regional Committee for Africa.
6. WHO. (2010b). *Resolution WHA63.16: WHO Global Code of Practice on the International Recruitment of Health Personnel*.
7. *The Abuja Declaration and the plan of action: an extract from the African Summit on Roll Back Malaria, Abuja, 25 April 2000 (WHO/CDS/RBM/2000.17)*, (2000). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67816>
8. Ouagadougou declaration on primary health care and health systems in africa: Achieving better health for Africa in the new millennium. (2008). *International Conference on Primary Health Care and Health Systems in Africa*.
9. Regional Committee for Africa. (2012). *Road map for scaling up the human resources for health for improved health service delivery in the African Region 2012–2025 (Document AFR/RC62/7)*, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259617>
10. MINSA. (2014). *Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário 2012-2025*.
11. *Lei de Base do Sistema Nacional de Saúde*, (1992) (testimony of Decreto Presidencial Lei nº 21-B/92 de 28 de Agosto).
12. *Regulamento Geral das Unidades Sanitárias do Serviço Nacional de Saúde*, (2003) (testimony of Decreto nº 54/03 de 5 de Agosto).
13. Costa, A., & Freitas, H. (2014). *Recursos Humanos da Saúde em Angola: Ponto de situação, evolução e desafios. (Documento de referência para a elaboração do PDRH 2013-2025)*.
14. WHO. (2019). *Contribuindo para a melhoria da Saúde em Angola - Relatório bianual 2018-2019*.
15. Macaia, D., & Lapão, L. V. (2017). The current situation of human resources for health in the province of Cabinda in Angola: is it a limitation to provide universal access to healthcare? *Human Resources for Health*, 15(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12960-017-0255-7>
16. MINSA. (2020). *Relatório do Governo Provincial de Cabinda, I Trimestre 2020*.
17. Secretaria Provincial da Saúde. (2018). *Relatório Diagnóstico da Secretaria de Cabinda 2018*.
18. Secretaria Provincial da Saúde. (2015). *Relatório da Secretaria provincial da Saúde de Cabinda. Ano 2014*.
19. Dussault, G., & Franceschini, M. C. (2006). Not enough there, too many here: understanding geographical imbalances in the distribution of the health workforce. *Human Resources for Health*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-4491-4-12>
20. Oliveira, M. dos S. de, & Artmann, E. (2009). Características da força de trabalho médica na Província de Cabinda, Angola. *Cadernos de Saúde Pública*. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2009000300009>
21. INE. (2014). *Resultados Preliminares do Recenseamento Geral da População e Habitação*.
22. World Health Organization. (2006). Working together for Health: World Health Report 2006. In *World Health*.
23. Issakov, A. (1994). Health care equipment: a WHO perspective. In C. Van Gruting (Ed.), *Medical devices: international perspectives on health and safety*. Elsevier.
24. WHO. (2010a). *Financiamento dos Sistemas de Saúde - O caminho para a cobertura universal*.
25. MINSA. (2019). *Melhoria dos Serviços da Saúde: “Não Deixar Ninguém para Trás.”*
26. *Decreto Presidencial 260/10 de 19 de Novembro. Regime Jurídico de Gestão Hospitalar*, (2010).
27. Rowe, A. K., de Savigny, D., Lanata, C. F., & Victora, C. G. (2005). How can we achieve and maintain high-quality performance of health workers in low-resource settings? *The Lancet*, 366(9490), 1026–1035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67028-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67028-6)
28. Dieleman, M., Gerretsen, B., & van der Wilt, G. J. (2009). Human resource management interventions to improve health workers' performance in low and middle income countries: a realist review. *Health Research Policy and Systems*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1478-4505-7-7>
29. World Health Organization. (2007). *Strengthening Health Systems to Improve Health Outcomes: WHO's Framework for Action*.

Factors influencing breastfeeding duration among Portuguese mothers

Fatores que influenciam a duração do aleitamento materno entre mães portuguesas

Mariana Z. de Oliveira ¹, Cíntia Ferreira-Pêgo ^{2*}

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

²CBIOS – Universidade Lusófona’s Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: cintia.pego@ulusofona.pt

Abstract

Breastfeeding is extensively associated with significant benefits for maternal and child health. The World Health Organization recommends that infants be breastfed up to 24 months. The decision to breastfeed is affected by many factors. The present study aimed to assess the factors contributing to the duration of breastfeeding. An online questionnaire was applied to 351 Portuguese mothers of infants under five years old to collect data on socioeconomic, obstetric, and breastfeeding factors. Conditions that contribute to the duration of breastfeeding were information and education about the topic ($p \leq 0.001$), residence area ($p \leq 0.001$), number of children ($p = 0.002$), duration of pregnancy ($p = 0.015$), previous experience with breastfeeding ($p \leq 0.001$), and difficulties during breastfeeding ($p = 0.035$). In conclusion, among the modifiable barriers which influence breastfeeding cessation, breastfeeding education and information is essential to improve breastfeeding rates.

Keywords: Breastfeeding; duration of breastfeeding; literacy; infant nutrition; Portugal

Resumo

O aleitamento materno está amplamente associado a benefícios significativos para a saúde materna e infantil. A Organização Mundial de Saúde recomenda que os bebés sejam amamentados até aos 24 meses. A decisão de amamentar é afetada por muitos fatores. O objetivo do presente estudo foi avaliar que fatores contribuem para a duração do aleitamento materno. Foi aplicado um questionário online a 351 mães portuguesas de bebés com menos de cinco anos de idade, a fim de recolher dados sobre fatores socioeconómicos, obstétricos e de aleitamento materno. As condições que contribuíram para a duração da amamentação foram o nível de informação e educação sobre o tema ($p \leq 0.001$), área de residência ($p \leq 0.001$), número de filhos ($p = 0,002$), duração da gravidez ($p = 0,015$), experiência anterior com a amamentação ($p \leq 0.001$), e dificuldades durante a amamentação ($p = 0,035$). Em conclusão, entre as barreiras modificáveis que influenciam a cessação do aleitamento materno, a educação e informação sobre o aleitamento materno são essenciais para melhorar as taxas de aleitamento materno e sua duração no tempo.

Palavras-chave: Amamentação; duração aleitamento materno; literacia; nutrição infantil; Portugal

Introduction

Breastfeeding is a birthright and crucial for the newborn's survival and is the most effective way to meet the baby's nutritional, immunological and psychological needs (1). Breastfeeding is extensively associated with the reduction of infant morbidity and mortality, as well as with significant benefits for maternal and child health (1–3). In Azores (Portugal), breastfeeding acted as a protective factor for childhood obesity (4). Exclusive breastfeeding also seems to have a potential protective influence on postpartum depression among women with prenatal depression, according to Portuguese researchers (5). Therefore, breastfeeding can be an effective, simple, and affordable tool (4), reducing public health costs by decreasing the use of services (6,7). The promotion and support of breastfeeding is a public health issue (2) and should not be seen as the exclusive responsibility of the woman and her family.

The current official recommendation is for breastfeeding exclusivity for the first six months of life, and to be accompanied by solid foods for at least two years, or for as long as mother and baby wish (9).

The worldwide prevalence of breastfeeding is lower than the recommendations of international organizations, especially in high-income countries, since the prevalence of breastfeeding at 12 months is lower than 20% in these countries (8). However, even in low-income and middle-income countries, only 37% of infants younger than 6 months are exclusively breastfed (8). In the United States of America and Australia only half of the mothers breastfeed their babies until they are six months old and, in the UK, only one-third do so (8,10). In Portugal, according to the Registry of Breastfeeding (Registo do Aleitamento Materno or RAM), in 2013, 98.6% of mothers started breastfeeding in the postpartum hospitalization, but only 76.7% continued the practice after being discharged from the hospital. The records from Primary Health Care show that exclusive breastfeeding between the fifth and sixth week was 88.1%; this percentage drops to 22.1% for five-month-old infants (11). Another publication refers that in Portugal in 2014, the prevalence of exclusive breastfeeding at 3, 4, and 6 months of age was 55.9, 48.5, and 30.3%, respectively (12).

Several factors contribute to the success of breastfeeding; these are described within a complex structure, which includes biological, psychological, and social factors that are linked together at various levels (8). The difficulties experienced by the puerperal woman during breastfeeding contribute significantly

Introdução

A amamentação é um direito de nascença e crucial para a sobrevivência do recém-nascido e é a forma mais eficaz de satisfazer as necessidades nutricionais, imunológicas e psicológicas do bebé (1). A amamentação está amplamente associada à redução da morbilidade e mortalidade infantil, bem como a benefícios significativos para a saúde materna e infantil (1-3). Nos Açores (Portugal), a amamentação comportou-se como um fator de proteção da obesidade infantil (4). Além disso, parece que o aleitamento materno exclusivo tem uma potencial influência protetora na depressão pós-parto entre mulheres com depressão pré-natal, segundo investigadores portugueses (5). Portanto, a amamentação pode ser uma ferramenta eficaz, simples e acessível (4), reduzindo os custos de saúde pública através da diminuição da utilização de serviços (6,7). A promoção e apoio ao aleitamento materno é uma questão de saúde pública (2) e não deve ser vista como uma responsabilidade exclusiva da mulher e da sua família.

A recomendação oficial atual é de que a exclusividade da amamentação seja de seis meses, e que prossiga durante o tempo que a mãe e o bebé desejarem, durante pelo menos dois anos (9).

A prevalência mundial do aleitamento materno é inferior às recomendações das organizações internacionais, especialmente nos países desenvolvidos, uma vez que a prevalência do aleitamento materno aos 12 meses é inferior a 20% nestes países (8). Nos Estados Unidos da América e Austrália, apenas metade das mães amamentam os seus bebés até aos seis meses de idade e, no Reino Unido, apenas um terço o faz (8,10). Em Portugal, segundo o Registo do Aleitamento Materno (RAM), em 2013, 98,6% das mães começaram a amamentar na hospitalização pós-parto, mas apenas 76,7% continuaram a prática após terem tido alta do hospital. Os registos dos Cuidados de Saúde Primários mostram que a amamentação exclusiva entre a quinta e sexta semana foi de 88,1%; esta percentagem cai para 22,1% para bebés de cinco meses (11). Outra publicação refere que em Portugal, em 2014, a prevalência de amamentação exclusiva aos 3, 4 e 6 meses de idade foi de 55,9, 48,5, e 30,3%, respetivamente (12). Contudo, mesmo nos países de baixo e médio rendimento, apenas 37% das crianças com menos de 6 meses são exclusivamente amamentadas (8).

Vários fatores contribuem para o sucesso da amamentação; estes são descritos dentro de uma estrutura complexa, que inclui fatores biológicos,

to the early interruption of breastfeeding and make mothers less likely to breastfeed a second child (13). However, to have more information about the barriers which mothers face when choosing to breastfeed their children is of great interest to health professionals to improve support and expand the assistance at a community level (14). In a pilot study developed in a region of Portugal, breastfeeding women receiving intensive support during the first 120 days postpartum showed promissory results in improving 'perception of breastfeeding self-efficacy' compared to conventional care, favoring breastfeeding duration and exclusivity, and cumulative breastfeeding competence of women/families (15).

For all these reasons, this study aimed to assess the factors which contribute to the prevalence of breastfeeding, namely the information available and education about this topic, support and difficulties which puerperal women may experience, and which of these factors influence early breastfeeding abandonment.

Sample and methods

Study design and population

A cross-sectional study was conducted, including a final sample of 351 volunteers. The inclusion criteria consisted of being mothers of children under five years old and having official residence in Portugal. No other non-inclusion criteria were established.

Data collection

Data collection was performed using an online questionnaire through the Google-Forms platform and all the data was self-reported. The questionnaire consisted of five groups of questions. The first group was sociodemographic characterization, namely age at motherhood, marital status, academic degree, occupation, residence, and income. In the second group of questions, obstetric data were collected, including duration of pregnancy, type of delivery, obstetric violence, and number of children. The third group was composed of fifteen questions to measure knowledge about breastfeeding, adapted from the breastfeeding scale (16). The fourth group of questions referred to personal experience with breastfeeding, previous experience, breastfeeding method, duration of breastfeeding, and introduction of infant formula. The fifth and final group of questions referred to the difficulties experienced during the breastfeeding

psicológicos e sociais que estão ligados entre si a vários níveis (8). As dificuldades sentidas pela mulher puérpera durante a amamentação contribuem significativamente para a interrupção precoce da amamentação e tornam menos provável que as mães amamentem um segundo filho (13). No entanto, ter mais informação sobre as barreiras que as mães enfrentam ao escolherem amamentar os seus filhos é de grande interesse para os profissionais de saúde para melhorar o apoio e expandir a assistência a nível comunitário (14). Num estudo piloto desenvolvido numa região de Portugal, as mulheres a amamentar que receberam apoio intensivo durante os primeiros 120 dias pós-parto, mostraram resultados promissores na melhoria da "percepção da autoeficácia da amamentação" em comparação com os cuidados convencionais, favorecendo a duração e exclusividade da amamentação, e a competência acumulada de amamentação das mulheres/famílias (15).

Por todas estas razões, este estudo visou avaliar os fatores que contribuem para a prevalência do aleitamento materno, nomeadamente a informação disponível e a educação sobre este tema, o apoio e as dificuldades que as mulheres puérperas podem experimentar, e quais destes fatores influenciam o abandono precoce do aleitamento materno.

Amostra e métodos

Desenho e população do estudo

Foi realizado um estudo transversal, incluindo uma amostra final de 351 voluntários. Os critérios de inclusão consistiram em mães de crianças com menos de cinco anos de idade e participantes com residência oficial em Portugal. Não foram estabelecidos outros critérios de não-inclusão.

A recolha de dados foi realizada utilizando um questionário online, através da plataforma *Google-Forms*[®] e todos os dados foram auto-reportados. O questionário consistia em cinco grupos de perguntas: O primeiro grupo foi de caracterização sociodemográfica, nomeadamente, idade materna; estado civil; grau académico; profissão; residência, e rendimentos. No segundo grupo de perguntas, foram recolhidos dados obstétricos: duração da gravidez; tipo de parto; violência obstétrica; o número de crianças. O terceiro grupo foi composto por quinze perguntas para medir os conhecimentos sobre amamentação, adaptadas da escala de amamentação (16). O quarto grupo de perguntas referia-se à experiência pessoal com a amamentação,

period. The questionnaire was shared on different social networks, mainly Facebook, Instagram, and WhatsApp.

Breastfeeding knowledge scores

The cut-off points of maternal knowledge concerning breastfeeding were made by identifying percentiles. Knowledge was considered “very poor” up to the 25th percentile (0 to 4 points), “poor” above the 25th percentile (5 to 8 points), “moderate” above the 50th percentile (9-11 points), and “good” above the 75th percentile (scores from 12 to 15).

Ethical Considerations

Before data collection, all individuals agreed to participate in the study, giving their informed and written consent to participate. Consent was obtained on the first page of the questionnaire, which included all the information of a “standard” informed consent. Only after reading all the information and selecting the option “I read and agree to participate in the present study” did participants have access to the remainder of the questions. If an individual selected the option “I read the information, and do not agree to participate in the present study,” she was sent to the end of the questionnaire with no access to any question. All the data was confidential and anonymous, and no other information about the participating individuals was collected. The objective of the study, the variables to be evaluated, and the maintenance of anonymity of the data were made available to the participants at the beginning of the questionnaire. The present study was performed following the ethical standards as outlined within the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Statistical analysis

The distribution of characteristics between groups was compared using Pearson χ^2 tests for categorical variables, where the units were expressed in % (n). To analyze the relationship between different variables influencing the duration of breastfeeding, four analysis groups were created: <6 months, 6-12 months, 12-18 months, 18-24 months, and > 24 months. Statistical analysis was performed using IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp. All statistical tests were two-tailed and the significance level was set at $p < 0.05$.

experiência anterior, método de amamentação, duração da amamentação, e introdução da fórmula infantil. O quinto, e último grupo de perguntas, referia-se às dificuldades experimentadas durante o período de aleitamento materno. O questionário foi compartilhado em diferentes redes sociais, principalmente Facebook, Instagram, e WhatsApp.

Níveis de conhecimento sobre aleitamento materno

Os pontos de corte dos conhecimentos maternos relativos ao aleitamento materno foram feitos através da identificação de percentis. O conhecimento foi considerado “muito pobre” até ao percentil 25 (0 a 4 pontos), “pobre” acima do percentil 25 (5 a 8 pontos), “moderado” acima do percentil 50 (9 a 11 pontos), e “bom” acima do percentil 75 (pontuações de 12 a 15).

Considerações éticas

Todos os indivíduos, antes da recolha de dados, concordaram em participar no estudo, dando o seu consentimento informado e escrito para a sua participação. O consentimento foi obtido na primeira página do questionário digital, que incluía todas as informações de um consentimento informado “normal”. Apenas após a leitura de todas as informações, e a seleção da opção “Li e concordo em participar no presente estudo”, é que os participantes tiveram acesso às perguntas. Se um indivíduo selecionou a opção “Li a informação, e não concordo em participar no presente estudo”, foi enviado para o final do questionário sem acesso a qualquer pergunta. Todos os dados foram confidenciais e anónimos, e nenhuma outra informação sobre estes indivíduos foi recolhida. No início do questionário, o objetivo do estudo, as variáveis a avaliar e a manutenção do anonimato dos dados foram colocados à disposição dos participantes. O presente estudo foi realizado seguindo as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsínquia de 1964 e as suas posteriores emendas ou normas éticas comparáveis.

Análise estatística

A distribuição das características entre grupos foi comparada utilizando testes Pearson χ^2 para variáveis categóricas, em que as unidades foram expressas em % (n). Para analisar a relação entre diferentes variáveis que influenciam a duração do aleitamento materno, os períodos foram agrupados em 4 grupos de análise: <6 meses, 6-12 meses, 12-18 meses, 18-24 meses, e > 24 meses. A análise estatística foi realizada utilizando IBM Corp. lançada em 2020. IBM SPSS Statistics para Windows, Versão 27.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Table 1 - General characteristics of the study population according to the score on breastfeeding questionnaire.
Tabela 1 - Características gerais da população em estudo de acordo com a pontuação do questionário sobre informação sobre amamentação.

	Total population / População total (n=351)	Poor / Fraco (n=32)	Reasonable / Razoável (n=115)	Good / Bom (n=204)	p-value ^a
Age / Idade, % (n)					
<18	0.3 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.5 (1)	0.425
18-24	6.3 (22)	6.3 (2)	5.2 (6)	6.9 (14)	
25-30	34.2 (120)	53.1 (17)	29.6 (34)	33.8 (69)	
31-35	39.6 (139)	25.0 (8)	45.2 (52)	38.7 (79)	
>35	19.7 (69)	15.6 (5)	20.0 (23)	20.1 (41)	
Civil status / Estado Civil, % (n)					
Single / Solteira	6.6 (23)	6.3 (2)	6.1 (7)	6.9 (14)	0.744
Married / Casada	50.1 (176)	53.1 (17)	45.2 (52)	52.5 (107)	
Cohabitation / União Estável	41.9 (147)	40.6 (13)	46.1 (53)	39.7 (81)	
Divorced / Divorciada	1.4 (5)	0.0 (0)	2.6 (3)	1.0 (2)	
Educational level / Escolaridade, % (n)					
Basic school / Ensino Básico	3.4 (12)	9.4 (3)	4.3 (5)	2.0 (4)	0.241
Secondary school / Ensino Secundário	25.6 (90)	25.0 (8)	27.8 (32)	24.5 (50)	
Graduation / Licenciatura	50.4 (177)	53.1 (17)	44.3 (51)	53.4 (109)	
Master / Mestrado	20.5 (72)	12.5 (4)	23.5 (27)	20.1 (41)	
Occupation / Ocupação, % (n)					
Student / Estudante	0.9 (3)	0.0 (0)	0.9 (1)	1.0 (2)	0.046
Domestic worker / Trabalhador doméstico	7.4 (26)	18.8 (6)	9.6 (11)	4.4 (9)	
Working/ Trabalhador	91.7 (322)	81.3 (26)	89.6 (103)	94.6 (193)	
Residence area / Zona de Residência, % (n)					
Alentejo	4.3 (15)	3.1 (1)	4.3 (5)	4.4 (9)	0.426
Algarve	4.6 (16)	3.1 (1)	3.5 (4)	5.4 (11)	
Center / Centro	20.5 (72)	34.4 (11)	20.0 (23)	18.6 (38)	
North / Norte	24.8 (87)	34.4 (11)	28.7 (33)	21.1 (43)	
Madeira	0.6 (2)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.5 (1)	
Azores / Açores	3.1 (11)	0.0 (0)	2.6 (3)	3.9 (8)	
Lisbon / Lisboa	42.2 (148)	25.0 (8)	40.0 (46)	46.1 (94)	
Monthly income / Rendimento mensal, % (n)					
< 1000€	15.1 (53)	21.9 (7)	14.8 (17)	14.2 (29)	0.39
1000-3000€	71.8 (252)	71.9 (23)	74.8 (86)	70.1 (143)	
> 3000€	13.1 (46)	6.3 (2)	10.4 (12)	15.7 (32)	
Children/ Filhos, % (n)					
1	55.8 (196)	53.1 (17)	70.4 (81)	48.0 (98)	0.01
2	37.3 (131)	43.8 (14)	25.2 (29)	43.1 (88)	
3	4.8 (17)	3.1 (1)	3.5 (4)	5.9 (12)	
≥ 4	2.0 (7)	0.0 (0)	0.9 (1)	2.9 (6)	

Data expressed in percentages (n). ^ap-values for comparisons between groups were tested using Pearson χ^2 tests. /

Dados expressos em percentagens (n). ^aValores de p para comparações entre grupos foram testados mediante testes de Pearson χ^2 .

Todos os testes estatísticos foram bi-caudais e o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

Results

Sociodemographic data

Most of the participants were mothers between 31-35 years old (39.6%), married or living in cohabitation (92%), graduated (50.4%), and working (91.7%), with a monthly income of between €1,000 and €3,000 (71.8%), who lived in the metropolitan area of Lisbon (42.2%) and had only one child (55.8%) (Table 1).

Breastfeeding results

According to the breastfeeding knowledge questionnaire, none of the women presented a “very poor” score (0-4 points), 9% had their knowledge

Resultados

Dados sociodemográficos

A maioria dos participantes eram mães entre os 31-35 anos (39,6%), casadas ou a viver em coabitação (92%), licenciadas (50,4%), e trabalhadoras (91,7%), com um rendimento mensal entre 1.000 e 3.000€ (71,8%), viviam na área metropolitana de Lisboa (42,2%) e tiveram apenas um filho (55,8%) (Tabela 1).

Resultados do aleitamento materno

De acordo com o questionário de conhecimentos sobre amamentação, nenhuma das mulheres apresentou uma classificação “muito pobre” (0-4 pontos), 9%

qualified as “poor” (5-8 points), 33% were qualified with “reasonable” knowledge (9-11 points) and 58% had a “good” qualification according to the questionnaire (12-15 points) (Figure 1). Table 1 summarizes the characteristics of the study population according to questionnaire score. The breastfeeding knowledge questions and the percentages of correct/incorrect answers for each are displayed in Table 2. The question with the highest number of incorrect answers was “Women who breastfeed should avoid potential allergens” (51.9%), and the statement with the highest number of correct answers was “Formula milk is a better source of nutrients than breast milk” (99.4%). 57% of the population in this study no longer breastfed their children, while 43% of participants were still breastfeeding their babies at the time of the survey. (Figure 2). Among women who were no longer breastfeeding, 49% had breastfed their children for more than 24 months and 29% for less than 6 months. (Figure 3). The most frequent problems with breastfeeding

tiveram os seus conhecimentos qualificados como "pobres" (5-8 pontos), 33% foram qualificadas com conhecimentos "razoáveis" (9-11 pontos) e 58% tiveram uma classificação "boa" no questionário (12-15 pontos) (Figura 1). O Tabela 1 resume as características da população do estudo de acordo com a pontuação do questionário. As perguntas de conhecimento sobre aleitamento materno e as percentagens de respostas correctas/incorrectas para cada uma podem ser observadas na Tabela 2. A pergunta com o maior número de respostas incorrectas foi "Mulheres que amamentam devem evitar potenciais alergénicos" (51,9%), e a afirmação com o maior número de respostas corretas foi "O leite de fórmula é uma melhor fonte de nutrientes do que o leite materno" (99,4%). 57% da população deste estudo já não amamentava os seus filhos, enquanto 43% das voluntárias continuavam a amamentar os seus bebés. (Figura 2). Entre as mulheres que já não estavam a amamentar, 49% tinham amamentado os seus filhos durante mais de 24 meses e 29% durante menos de 6 meses. (Figura 3). Os problemas mais frequentes com

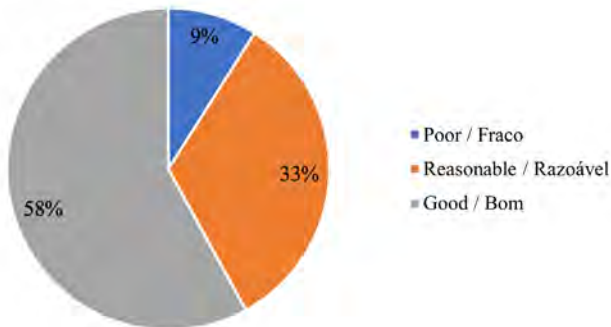


Figure 1 - Level of knowledge about breastfeeding.
Figura 1 - Nível de conhecimento sobre amamentação.

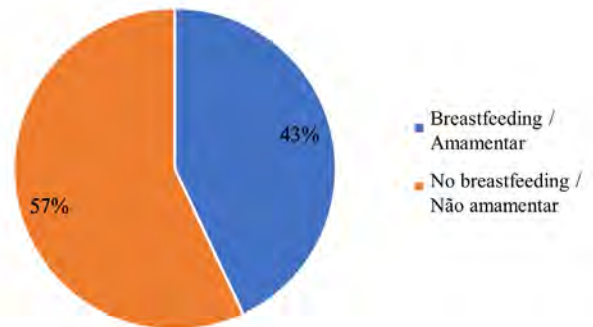


Figure 2 - Prevalence of breastfeeding.
Figura 2 - Prevalência da amamentação.

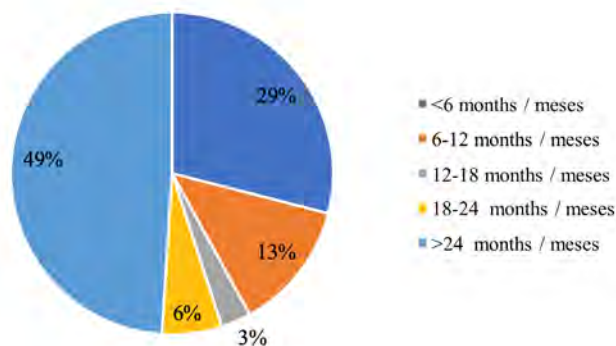


Figure 3 - Duration of breastfeeding.
Figura 3 - Duração da amamentação.

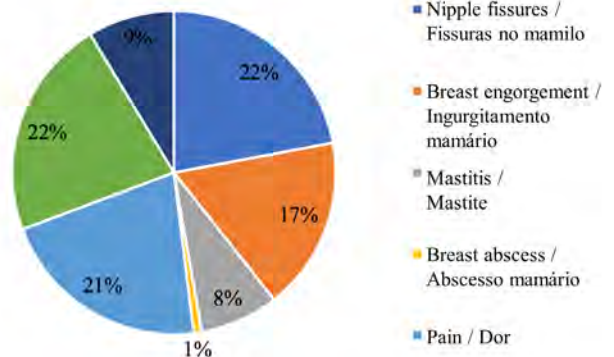


Figure 4 - Problems with breastfeeding.
Figura 4 - Problemas com amamentação.

reported were nipple (skin) cracking and pain during breastfeeding (28% and 27%, respectively) (Figure 4).

The main factors influencing the duration of breastfeeding were residence area, the number of children, duration of pregnancy, previous experience with breastfeeding, information and education about breastfeeding, and difficulties during breastfeeding (Table 3).

a amamentação foram fissuras nos mamilos e dores durante a amamentação (28% e 27%, respetivamente) (Figura 4).

Os principais fatores que influenciaram a duração da amamentação foram a área de residência, o número de filhos, a duração da gravidez, a experiência anterior com a amamentação, informação e educação sobre o aleitamento materno, e dificuldades durante o aleitamento materno (Tabela 3).

Table 2 - Questionnaire content related to breastfeeding knowledge, with percentage and number of participants who answered correctly and incorrectly for each question.

Tabela 2 - Conteúdo do questionário relacionado com o conhecimento do aleitamento materno, com percentagem e número de participantes que responderam correcta e incorrectamente para cada pergunta.

True or false questions / Questões de Verdadeiro e Falso		Correct / Corretas, % (n)	Incorrect / Incorretas, % (n)
-Formula milk has the same characteristics as breast milk. / -O leite de fórmula tem as mesmas características do leite materno.	False / Falso	96.9 (340)	3.1 (11)
-The amount and composition of breast milk is adjusted to the baby's demand. / -A quantidade e composição do leite materno é ajustada à demanda do bebé.	True / Verdadeiro	96.6 (339)	3.4 (12)
-Formula milk is a better source of nutrients than breast milk. / -O leite de fórmula é melhor fonte de nutrientes do que o leite materno/	False / Falso	99.4 (349)	0.6 (2)
-It is not important to breastfeed your baby right after birth and colostrum (first milk) should be discarded. / -Não é importante amamentar o bebé logo após o nascimento e o colostro (primeiro leite) deve ser descartado.	False / Falso	99.1 (348)	0.9 (3)
-Drinking milk or eating oats increases milk production. / -Beber leite ou comer aveia aumentam a produção de leite.	False / Falso	70.4 (247)	29.6 (104)
-Women who breastfeed should avoid potential allergens. / -Mulheres que amamentam devem evitar potenciais alérgenos.	False / Falso	48.1 (169)	51.9 (182)
-Babies breastfed with breast milk develop more slowly. / -Bebês amamentados com leite materno desenvolvem-se mais lentamente.	False / Falso	95.7 (336)	4.3 (15)
-Breastfeeding improves the baby's brain development. / -Amamentação melhora o desenvolvimento cerebral do bebé.	True / Verdadeiro	76.6 (269)	23.4 (82)
-For health it is indifferent to be fed breast milk or formula. / -Para a saúde é indiferente ser alimentado com leite materno ou fórmula.	False / Falso	79.5 (314)	10.5 (37)
-Formula-fed babies are at greater risk of becoming obese in adulthood. / -Bebês alimentados com fórmula tem maior risco de ser tornarem obesos na vida adulta.	True / Verdadeiro	57.7 (178)	49.3 (173)
-A breastfeeding woman has a lower risk of developing breast and ovarian cancer. / -A mulher que amamenta tem menor risco de desenvolver cancro da mama e do ovário.	True / Verdadeiro	82.1 (288)	17.9 (63)
-A breastfeeding woman is at increased risk of developing Type II Diabetes. / -A mulher que amamenta tem maior risco de desenvolver Diabetes tipo II.	False / Falso	69.8 (245)	30.2 (106)
-It is recommended that a baby start eating solid foods between 3 and 5 months of age. / -Recomenda-se que um bebé comece a comer alimentos sólidos entre 3 a 5 meses de idade.	False / Falso	92.6 (325)	7.4 (26)
-The baby should be fed every 3 hours for the first few weeks. / -O bebé deve ser alimentado a cada 3 horas nas primeiras semanas.	False / Falso	61.5 (216)	38.5 (135)
-Breastfeeding must be continued at least until 2 years old, any weaning before that age is considered early. / -A amamentação deve ser continuada pelo menos até aos 2 anos, qualquer desmame antes dessa idade é considerado precoce.	True / Verdadeiro	53.0 (186)	47.0 (165)

Data expressed in percentages (n) / Dados expressos em percentagens (n)

Table 3 - Factors influencing the duration of breastfeeding.
Tabela 3 - Fatores que influenciam a duração da amamentação.

	Weaning population / População desmame (n=200)	<6 months / meses (n=58)	6-12 months / meses (n=26)	12-18 months / meses (n=7)	18-24 months / meses (n=12)	>24 months / meses (n=97)	p-value ^a
Residence area / Zona de Residência, %(n)							
Alentejo	3.5 (7)	3.4 (2)	3.8 (1)	14.30(1)	0.0 (0)	3.1 (3)	
Algarve	5.5 (11)	3.4 (2)	0.0 (0)	14.30(1)	8.3 (1)	7.2 (7)	
Center / Centro	21.0 (42)	29.3 (17)	4.8 (2)	14.30(1)	8.3 (1)	21.6 (21)	
North / Norte	23.0 (43)	34.5 (20)	19.2 (5)	28.6(2)	0.0 (0)	19.6 (19)	<0.001
Madeira	1.0 (2)	1.7 (1)	0.0 (0)	0.00(0)	0.0 (0)	1.0 (1)	
Azores / Açores	3.0 (6)	0.0 (0)	11.5 (3)	0.00(0)	25.0 (3)	0.0 (0)	
Lisbon / Lisboa	43.0 (86)	27.6 (16)	57.7 (15)	28.60(2)	58.3 (7)	47.4 (46)	
Children / Filhos, %(n)							
1	56.5 (113)	74.1 (43)	57.7 (15)	71.40(5)	50.0 (6)	45.4 (44)	
2	38.0 (76)	25.9 (15)	42.3 (11)	14.30(1)	25.0 (3)	47.4 (46)	
3	4.5 (9)	0.0 (0)	0.0 (0)	14.30(1)	25.0 (3)	5.2 (5)	0.002
≥4	1.0 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.00(0)	0.0 (0)	2.1 (2)	
Pregnancy duration / Duração gravidez, %(n)							
Preterm / Pré-termo	9.5 (19)	12.1 (7)	7.7 (2)	0.00(0)	8.3 (1)	9.3 (9)	
Term / Termo	64.5 (129)	44.8 (26)	84.6 (22)	71.40(5)	83.3 (10)	68.0 (66)	0.015
Post-term / Pós- termo	26.0 (52)	43.1 (25)	7.7 (2)	28.6(2)	8.3 (1)	22.7 (22)	
Previous experience / Experiência prévia, %(n)							
No / Não	68.0 (136)	87.9 (51)	73.1 (19)	71.40(5)	50.0 (6)	56.7 (55)	
Yes / Sim	32.0 (64)	12.1 (7)	26.9 (7)	28.60(2)	50.0 (6)	43.3 (42)	
Knowledge / Conhecimento%(n)							
Poor / Fraco	11.0 (22)	20.7 (12)	3.8 (1)	0.00(0)	0.0 (0)	9.3 (9)	
Reasonable / Razoável	35.5 (71)	48.3 (28)	18.3 (13)	42.90(3)	58.3 (7)	20.6 (20)	<0.001
Good / Bom	53.5 (107)	31.0 (18)	46.2 (12)	57.10(4)	41.7 (5)	70.1 (68)	
Breastfeeding difficulties / Dificuldades amamentação, %(n)							
Yes / Sim	71.4 (142)	57.9 (33)	88.5 (23)	85.70(6)	83.3 (10)	72.2 (70)	0.035
No / Não	28.6 (57)	42.1 (24)	11.5 (3)	14.30(1)	16.7 (2)	27.8 (27)	

Data expressed in percentages (n). ^ap-values for comparisons between groups were tested using Pearson χ^2 tests. /

Dados expressos em percentagens (n). ^aValores de p para comparações entre grupos foram testados mediante testes de Pearson χ^2 .

Discussion

The present work was one of the first studies to look into which factors influenced the duration of breastfeeding according to World Health Organization guidelines (9) in Portuguese women with children younger than 5 years old.

The main results show a significant association between maternal information about breastfeeding and the duration of breastfeeding. Women who breastfed their children for more than 2 years also presented higher scores on the breastfeeding information questionnaire, while women who breastfed their children for less than 6 months showed lower scores. Similar results were also observed by different authors (17,18). Thereafter, we demonstrated that the highest level of knowledge about breastfeeding is a protective factor against the early cessation of breastfeeding. According to the percentages

Discussão

O presente trabalho foi um dos primeiros estudos a analisar quais os fatores que influenciaram a duração da amamentação de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (9), em mulheres portuguesas com filhos com menos de 5 anos de idade.

Os principais resultados mostram uma associação significativa entre a informação materna sobre amamentação e a duração do aleitamento materno. Além disso, as mulheres que amamentaram os seus filhos durante mais de 2 anos, também apresentaram pontuações mais elevadas no questionário de informação sobre amamentação, enquanto as mulheres que amamentaram os seus filhos durante menos de 6 meses apresentaram pontuações mais baixas. Resultados semelhantes foram também observados por diferentes autores (17,18). Posteriormente, demonstrámos que o

of incorrect answers, 47% of mothers are not informed about the recommendation (9) "Breastfeeding should be maintained until, at least, 2 years old; before that age, it is considered premature cessation". Furthermore, 49.3% of them are unaware that "Formula-fed babies have an increased risk of becoming obese in adulthood" according to the last evidence (19). This performance shows that mothers who choose not to breastfeed may not be fully informed about the consequences of this choice. Over 50% of participants believe that "Lactating mothers should avoid potential allergens", which do not correspond with the most recent published literature (20). A study conducted in Poland shows similar performance among participants, where 44.6% of the participants also believed they should avoid these foods. According to the same study, the authors conclude that the difficulties of a restrictive diet can be one of the causes for the early interruption of breastfeeding (21). This mechanism could be one of the explanations for the premature cessation of breastfeeding of our sample.

The difficulties during breastfeeding also have a significant relationship with the abandonment of breastfeeding. The problems reported by the participants in this study were registered in literature as transitory (13,22), which reinforces the need to provide more information about the management of these difficulties, so that they can be overcome and, consequently, not compromise the continuity of breastfeeding.

The number of children and the previous experience with breastfeeding seem to be two important factors that correlate and influence the duration of breastfeeding. It has been reported that the highest rates of early abandonment are of women who are breastfeeding for the first time, consequently, a previous positive experience and the knowledge acquired during a first breastfeeding experience are protective factors of the longest duration of breastfeeding (13,14).

The duration of pregnancy was also a non-modifiable factor that significantly influenced breastfeeding. In the present analysis, women who had their labor induced had the highest rates of early breastfeeding cessation. However, the scientific literature has not reached a consensus about the topic, since some authors claim that the form of birth influences breastfeeding duration (23), however, other authors found contrary results (14,24).

nível mais elevado de conhecimento sobre o aleitamento materno pode ser um fator de proteção contra a cessação precoce do aleitamento materno. De acordo com as percentagens de respostas incorretas, 47% das mães têm conhecimentos errados sobre a recomendação "O aleitamento materno deve ser mantido até, pelo menos, aos 2 anos de idade; antes dessa idade, é considerado uma cessação prematura" (9). Além disso, 49,3% delas desconhecem que "os bebês alimentados com fórmulas têm um risco acrescido de se tornarem obesos na idade adulta", de acordo com as últimas evidências (19). Este desempenho mostra que as mães que optam por não amamentar podem não estar completamente informadas sobre as consequências desta escolha. Mais de 50% dos participantes acreditam que "As mães lactantes devem evitar potenciais alergênicos", o que não corresponde à literatura mais recentemente publicada (20). Um estudo realizado na Polónia mostra um desempenho semelhante entre os participantes, onde 44,6% dos participantes também acreditam que devem evitar estes alimentos. De acordo com o mesmo estudo, os autores concluem que as dificuldades de uma dieta restritiva podem ser uma das causas da interrupção precoce da amamentação (21). Este mecanismo poderia ser uma das possíveis explicações para a interrupção prematura da amamentação da nossa amostra.

As dificuldades durante a amamentação têm também uma relação significativa com o abandono da amamentação. Os problemas relatados pelos participantes neste estudo foram registados na literatura como transitórios (13,22), o que reforça a necessidade de fornecer mais informações sobre a gestão destas dificuldades, para que possam ser ultrapassadas e, conseqüentemente, não comprometam a continuidade do aleitamento materno.

O número de crianças e a experiência anterior com o aleitamento materno parecem ser dois fatores importantes que correlacionam e influenciam a duração do aleitamento materno. Tem sido relatado que as taxas mais elevadas de abandono precoce são de mulheres que amamentam pela primeira vez, conseqüentemente, uma experiência positiva anterior e os conhecimentos adquiridos durante uma primeira experiência de amamentação são fatores protetores de uma duração superior do aleitamento materno (13,14).

A duração da gravidez foi também um fator não modificável que influenciou significativamente o aleitamento materno. Na presente análise, as mulheres que tiveram o seu parto induzido tiveram as taxas mais elevadas de cessação precoce da amamentação. Contudo, a literatura científica não chegou a um consenso sobre o tema, uma vez que alguns autores afirmam que a

In conclusion, breastfeeding must be widely encouraged, due to its countless benefits for maternal-infant health and also for the whole society (2,25,26). Since the information about breastfeeding obtained by women comes mostly from health professionals (17), it is important to increase the awareness, commitment, and training of these professionals for the management of modifiable barriers that prevent the optimal duration of breastfeeding, so that they can implement the support which improves the practice.

Limitations of the study

Regarding the limitations of this study, it is important to mention the self-reported data collection, as the results may be subject to social desirability. The sample is composed mostly of married women or women within a stable union, presenting an average socioeconomic level, and the large number of women who breastfeed their children for more than 2 years might not be representative of the Portuguese population. The fact that the questionnaire was not previously validated nor a pre-test performed are also important limitations that should be assumed. We could also mention the memory bias; however, the literature sustains that maternal memory of the duration of breastfeeding is a reliable and valid estimate (27). Finally, it is important to refer that the cross-sectional design of the study is an important limitation as it is not possible to establish a cause-effect relationship.

Practical implications

After identifying the factors that influence early cessation of breastfeeding, we could conclude that knowledge is a modifiable factor which has a high impact on the duration of breastfeeding. For all these reasons, education is a fundamental part of public health; with knowledge, it is possible to understand the difficulties associated with breastfeeding, as well as clarify doubts that may prevent the beginning and continuation of breastfeeding. Training health professionals and having their commitment to the dissemination of breastfeeding recommendations are essential in the process of encouraging prolonged breastfeeding (28). Therefore, it is crucial to educate women and promote public health policies encouraging breastfeeding.

duração da gravidez e a forma de parto influenciam a duração da amamentação (23), contudo, outros autores encontraram resultados contrários (14,24).

Em conclusão, o aleitamento materno deve ser amplamente encorajado, devido aos seus inúmeros benefícios para a saúde materno-infantil e também para toda a sociedade (2,25,26). Uma vez que a informação sobre o aleitamento materno obtida pelas mulheres provém principalmente de profissionais de saúde (17), é importante aumentar a sensibilização, o empenho e a formação destes profissionais para a gestão de barreiras modificáveis que impedem a duração ótima do aleitamento materno, para que possam implementar o apoio que melhora a prática.

Limitações do estudo

Relativamente às limitações deste estudo, é importante mencionar a recolha de dados auto-reportados, já que os resultados podem estar sujeitos a deseabilidade social. A amostra é composta principalmente por mulheres casadas ou em união estável, apresentando um nível socioeconómico médio, e o facto de um grande número de mulheres que amamentam os seus filhos durante mais de 2 anos, pode não ser representativo da população portuguesa. O facto de o questionário não ter sido previamente validado nem ter sido realizado um pré-teste, é também uma limitação importante que deve ser assumida. Deveremos também mencionar a limitação de memória; contudo, a literatura sustenta que a memória materna da duração da amamentação é uma estimativa fiável e válida (27). Finalmente, é importante referir que o desenho transversal do estudo, é uma limitação importante, uma vez que não é possível estabelecer uma relação causa-efeito.

Implicações práticas

Após identificar os fatores que influenciam a cessação precoce da amamentação, podemos concluir que o conhecimento é um fator modificável, que tem um impacto elevado na duração do aleitamento materno. Por todas estas razões, a educação é uma parte fundamental da saúde pública. Com conhecimento, é possível compreender as dificuldades associadas ao aleitamento materno, bem como esclarecer dúvidas que possam impedir o início e a continuação do aleitamento materno. A formação de profissionais de saúde e o seu empenho na divulgação das recomendações de aleitamento materno são essenciais no processo de incentivo ao aleitamento materno prolongado (28). Por conseguinte, é crucial educar as mulheres e promover políticas de saúde pública que encorajem o aleitamento materno.

Directions for future research

Additional studies should be conducted to identify the population at risk and to know which educational resources are the most effective to increase knowledge among the population. Future public health campaigns, as well as the presence of a breastfeeding consultant regularly close to the new mother, should be encouraged in a way to increase breastfeeding duration.

Conclusion

In conclusion, the main factors contributing to the duration of breastfeeding in the present analyses were residence, the number of children, duration of pregnancy, previous experience with breastfeeding, information and education about breastfeeding, and difficulties during breastfeeding.

Author's Contributions Statement

M.O.: conceptualization and study design; experimental implementation; data analysis; figures and graphics; drafting; C.F.-P.: editing and reviewing; supervision and 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.

Acknowledgments

The authors thank all the participants of this study.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Direções para a investigação futura

Deverão ser realizados estudos adicionais para identificar a população em risco e para saber quais os recursos educativos mais eficazes para aumentar o conhecimento entre a população. Futuras campanhas de saúde pública, bem como a presença de uma consultora em amamentação regularmente próxima da nova mãe, devem ser encorajadas de forma a aumentar a duração do aleitamento materno.

Conclusões

Em conclusão, os principais fatores que contribuíram para a duração da amamentação na amostra analisada foram a área de residência, o número de filhos, a duração da gravidez, a experiência anterior com o aleitamento materno, informação e educação sobre o aleitamento materno, e dificuldades durante o aleitamento materno.

Declaração de Contribuições do Autor

M.O.: conceptualização e conceção do estudo; implementação experimental; análise de dados; figuras e gráficos; escrita; C.F.-P.: edição e revisão; supervisão e 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 foi 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 deste estudo.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

References / Referências

1. Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. *Pediatria Medica e Chirurgica*, 39(2). <https://doi.org/10.4081/PMC.2017.155>
2. Brown, A. (2017). Breastfeeding as a public health responsibility: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 30(6), 759–770. <https://doi.org/10.1111/jhn.12496>
3. Shamir, R. (2016). The Benefits of Breast Feeding. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 86, 67–76. <https://doi.org/10.1159/000442724>
4. Ferreira, A. V., Rosendo, I., Santiago, L. M., & Simões, J. A. (2021). Breastfeeding and childhood obesity in the azores. *Family Medicine and Primary Care Review*, 23(1), 81–86. <https://doi.org/10.5114/fmpcr.2021.103151>
5. Figueiredo, B., Pinto, T. M., & Costa, R. (2021). Exclusive Breastfeeding Moderates the Association Between Prenatal and Postpartum Depression. *Journal of Human Lactation*, 37(4), 784–794. <https://doi.org/10.1177/0890334421991051>
6. Bartick, M. C., Schwarz, E. B., Green, B. D., Jegier, B. J., Reinhold, A. G., Colaizy, T. T., ... Stuebe, A. M. (2017). Suboptimal breastfeeding in the United States: Maternal and pediatric health outcomes and costs. *Maternal and Child Nutrition*, 13(1), e12366. <https://doi.org/10.1111/mcn.12366>
7. Pokhrel, S., Quigley, M. A., Fox-Rushby, J., McCormick, F., Williams, A., Trueman, P., ... Renfrew, M. J. (2015). Potential economic impacts from improving breastfeeding rates in the UK. *Archives of Disease in Childhood*, 100(4), 334–340. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306701>
8. Victora, C. G., Bahl, R., Barros, A. J. D., França, G. V. A., Horton, S., Krasevec, J., ... Richter, L. (2016, January 30). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
9. World Health Organization. (2014). WHO | WHO Global Data Bank on Infant and Young Child Feeding. *Who*, 1–2. Retrieved from <https://apps.who.int/nutrition/databases/infantfeeding/en/index.html>
10. Levy, L., & Bertolo, H. (2012). Manual de Aleitamento Materno - Comitê Português para UNICEF. Comissão Nacional de Iniciativa Hospitais Amigos dos bebês.
11. Direção Geral de Saúde. (2009). Direção-Geral da Saúde. Retrieved from <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/iv-relatorio-com-os-dados-do-registo-do-aleitamento-materno-2013.aspx>
12. Conselho Nacional de Saúde. (2018). *Gerações Mais Saudáveis: Políticas públicas de promoção da saúde das crianças e jovens em Portugal*. Retrieved from <http://www.cns.min-saude.pt/wp-content/uploads/2018/12/GERACOES-MAIS-SAUDAVEIS.pdf>
13. Palmér, L. (2019). Previous breastfeeding difficulties: an existential breastfeeding trauma with two intertwined pathways for future breastfeeding—fear and longing. *International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-Being*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/17482631.2019.1588034>
14. Sayres, S., & Visentin, L. (2018, August 1). Breastfeeding: Uncovering barriers and offering solutions. *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000647>
15. Pádua, A. R., Melo, E. M., & Alvarelhão, J. J. (2022). An Intervention Program Based on Regular Home Visits for Improving Maternal Breastfeeding Self-efficacy: A Pilot Study in Portugal. *Maternal and Child Health Journal*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10995-021-03361-7>
16. Míno, K. C., De Oliveira Toso, B. R. G., Piva, E. K., & Christoffel, M. M. (2020). Validation of the knowledge breastfeeding scale into Brazilian Portuguese. *ACTA Paulista de Enfermagem*, 33. <https://doi.org/10.37689/ACTA-APE/2020AO0067>
17. Suárez-Cotelo, M. del C., Movilla-Fernández, M. J., Pita-García, P., Arias, B. F., & Novío, S. (2019). Breastfeeding knowledge and relation to prevalence. *Revista Da Escola de Enfermagem*, 53. <https://doi.org/10.1590/S1980-220X2018004503433>
18. Wallenborn, J. T., Ihongbe, T., Rozario, S., & Masho, S. W. (2017). Knowledge of Breastfeeding Recommendations and Breastfeeding Duration: A Survival Analysis on Infant Feeding Practices II. *Breastfeeding Medicine*, 12(3), 156–162. <https://doi.org/10.1089/bfm.2016.0170>
19. Bogen, D. L., Hanusa, B. H., & Whitaker, R. C. (2004). The effect of breast-feeding with and without formula use on the risk of obesity at 4 years of age. *Obesity Research*, 12(9), 1527–1535. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.190>
20. Greer, F. R., Sicherer, S. H., Wesley Burks, A., Abrams, S. A., Fuchs, G. J., Kim, J. H., ... Schwarzenberg, S. J. (2019). The effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: The role of maternal dietary restriction, breastfeeding, hydrolyzed formulas, and timing of introduction of allergenic complementary foods. *Pediatrics*, 143(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0281>
21. Zielińska, M. A., Sobczak, A., & Hamułka, J. (2017). Breastfeeding knowledge and exclusive breastfeeding of infants in first six months of life. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 68(1), 51–59.
22. Gianni, M. L., Bettinelli, M. E., Manfra, P., Sorrentino, G., Bezze, E., Plevani, L., ... Mosca, F. (2019). Breastfeeding difficulties and risk for early breastfeeding cessation. *Nutrients*, 11(10), 2266. <https://doi.org/10.3390/nu11102266>
23. Santacruz-Salas, E., Aranda-Reneo, I., Segura-Fragoso, A., Cobo-Cuenca, A. I., Laredo-Aguilera, J. A., & Carmona-Torres, J. M. (2020). Mothers' expectations and factors influencing exclusive breastfeeding during the first 6 months. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph17010077>
24. Robert, E., Coppeters, Y., Swennen, B., & Dramaix, M. (2014). Breastfeeding duration: A survival analysis - Data from a regional immunization survey. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/529790>
25. Binns, C., Lee, M., & Low, W. Y. (2016). The Long-Term Public Health Benefits of Breastfeeding. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, 28(1), 7–14. <https://doi.org/10.1177/1010539515624964>
26. Spiro, A. (2017). The public health benefits of breastfeeding. *Perspectives in Public Health*, 137(6), 307–308. <https://doi.org/10.1177/1757913917734139>
27. Natland, S. T., Andersen, L. F., Nilsen, T. I. L., Forsmo, S., & Jacobsen, G. W. (2012). Maternal recall of breastfeeding duration twenty years after delivery. *BMC Medical Research Methodology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-12-179>
28. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2016). Committee Opinion No. 658: Optimizing Support for Breastfeeding as Part of Obstetric Practice. *Obstetrics and Gynecology*, 127(2), e86–e92. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001318>

Anthropometric evaluation of pre-school and school-age children from the European Macaronesian region

Avaliação antropométrica de crianças em idade pré-escolar e escolar da Macaronésia Europeia

Nelson Tavares *, Tatiana Silva, Cíntia Ferreira-Pêgo †

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

*current affiliation / afiliação actual: Natiris, Portugal

†corresponding author / autor para correspondência: cintia.peg@ulusofona.pt

Abstract

The growing prevalence of childhood obesity has triggered an interest in the effects of excessive weight gain in childhood. The identification of overweight and obese children at an early stage and their referral to start a treatment designed to achieve and/or maintain a healthy weight comprise fundamental foundations in sustaining a healthy state. A cross-sectional analysis was conducted to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in preschool and school children in the archipelago of Madeira and Azores, and the Canary Islands. The sample included 3481 individuals (1,768 boys and 1,713 girls) aged 3 to 9 years. The prevalence of pre-obesity (20.90% vs. 16.50%) and obesity (14.10% vs. 13.00%) was higher in girls and the Odds Ratio of overweight and obesity was higher in girls and between 4 and 9 years. The boys from Madeira and the Azores and the girls from Madeira had a higher probability [1.30 (1.02-1.67)] of having a high Body Mass Index. The results expose the need for educational strategies and interventional measures that contribute to the control of childhood obesity.

Keywords: Anthropometric evaluation; Children; European Macaronesia; Obesity; Overweight

Resumo

A obesidade infantil tem vindo a revelar uma crescente prevalência desencadeando um interesse no que concerne aos efeitos do ganho de peso excessivo na infância. A identificação de crianças com pré-obesidade e obesidade numa fase precoce e o encaminhamento das mesmas no sentido de iniciar um tratamento que vise o alcance e/ ou manutenção de um peso saudável compreendem alicerces fundamentais na sustentação de um estado de saúde. Foi desenvolvida uma análise transversal para avaliar a prevalência de peso normal, pré-obesidade e obesidade em crianças em idade pré-escolar e escolar na Madeira, nos Açores e nas Canárias. A amostra incluiu 3481 indivíduos (1768 rapazes e 1713 raparigas) com idades entre os 3 e 9 anos. A prevalência de pré-obesidade (20,90% vs. 16,50%) e obesidade (14,10% vs. 13,00%) revelou-se superior nas raparigas e em indivíduos residentes na Madeira e nos Açores. Os resultados expõem a necessidade da existência de estratégias educativas, medidas de saúde pública e de medidas interventivas que contribuam para um controlo da obesidade em diversos países do mundo.

Palavras-chave: Avaliação antropométrica; Crianças; Macaronésia Europeia; Obesidade; Pré-obesidade

Introduction

Obesity is characterized as a multifactorial disease that has been described as having a dynamic phase (becoming obese) and a static phase (maintenance of a given level of obesity). Its cause has been traced to physiological and behavioral factors and not simply the result of excessive feeding. The treatment for obesity is extremely complex and is not fully resolving, focusing on physiological theories (focusing on genetics, metabolic rates, and fat cells), behavioral (focusing on physical activity and food intake) and restrictive (analysing the effects of (mental) cognitions on the physiological process of (bodily) feeding).

Childhood obesity has triggered an exponential increase in interest in the effects resulting from excessive weight gain in childhood, due to the progressive increase in its rate and the fact that the development of adipose cellularity in this period is determinant in the patterns of body composition of an adult individual (1), as well as a potential instigator of comorbidities such as type 2 diabetes mellitus, hypertension, nonalcoholic fatty liver, obstructive sleep apnea and dyslipidemias (2). In addition to these integral factors in health areas, obesity also carries unnecessary financial burdens and therefore its prevention is extremely relevant, as well as the identification of overweight and obese children at an early stage so that they can be referred to initiate treatment aiming to achieve and/or maintain a healthy weight (3).

Many studies carried out in several countries worldwide have shown a significant and growing number of overweight or obese children, such as Israel, which has increased its prevalence from 5.8% to 11.9%, and Malta, which has grown from 7.4% to 13.4% (4), revealing that childhood obesity has become a challenging problem.

In Portugal, approximately 31.6% of children aged 7 to 8 years presented as overweight (including obesity) (5). Some studies that investigated the prevalence of overweight and obesity in childhood and adolescence, including students from schools in the archipelagos of Madeira and the Azores (6–10), have found high levels of obesity (11). In Spain, specifically in the Canary Islands, 32.8% of individuals analyzed aged between 2 and 24 years are overweight, of whom 18% presented obesity (12), placing it as the autonomous community with one of the highest rates of childhood obesity in the entire Spanish territory (13,14). But few studies in Portugal and Spain assess the prevalence of overweight (including obesity) with preschool and school children and in this sense, considering all the

Introdução

A obesidade caracteriza-se por uma doença multifatorial que tem vindo a ser descrita como detentora de uma fase dinâmica (tornar-se obeso) e de uma fase estática (manutenção de um dado nível de obesidade). Tem sido traçada como causada por fatores fisiológicos e comportamentais e não simplesmente como um produto resultante de uma alimentação excessiva e o seu tratamento é extremamente complexo não sendo passível de resolução total, enveredando por teorias fisiológicas (com foco na genética, taxas metabólicas e células gordas), comportamentais (que se centram na atividade física e na ingestão de alimentos) e restritivas (que analisam os efeitos das cognições (mente) sobre o processo fisiológico da alimentação (corpo)).

A obesidade infantil tem desencadeando um interesse exponencial no que concerne aos efeitos resultantes do ganho de peso excessivo na infância, devido ao aumento progressivo da sua taxa e ao facto de que o desenvolvimento do tecido adiposo neste período é determinante nos padrões de composição corporal de um indivíduo adulto (1), bem como um potencial instigador de comorbilidades tais como a diabetes mellitus tipo 2, a hipertensão, a Esteatose hepática não alcoólica, a apneia obstrutiva do sono e as dislipidemias (2). Adicionalmente a estes fatores integrantes em âmbitos de saúde, a obesidade acarreta também encargos dispendiosos do foro financeiro sendo, por isso, extremamente relevante a sua prevenção, bem como a identificação de crianças com excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) numa fase precoce para que as mesmas possam ser encaminhadas no sentido de iniciar um tratamento que vise o alcance e/ou manutenção de um peso saudável (3).

Vários estudos efetuados em diversos países a nível mundial têm vindo a demonstrar um número significativo e crescente de crianças com sobrepeso ou obesidade como é o caso de Israel que aumentou a sua prevalência de 5,8% para 11,9% e de Malta que apresentou um crescimento de 7,4% para 13,4% (4), revelando que a obesidade infantil tem-se vindo a tornar num problema desafiador.

Em Portugal, cerca de 31,6% das crianças com 7 a 8 anos de idade apresenta excesso de peso (5) e nos arquipélagos da Madeira e dos Açores, alguns estudos que investigaram a prevalência de pré-obesidade e obesidade na infância e adolescência (6–10), detetaram elevados níveis de obesidade (11). Em Espanha, especificamente nas Ilhas Canárias, 32,8% dos indivíduos com idades compreendidas entre os 2 e os

pretexts mentioned above, the primary objective of the present analysis was the evaluation of anthropometric data of a sample of preschool and school children and subsequent assessment of the prevalence of normal weight, overweight and obesity in the region designated as European Macaronesia.

Materials and Methods

Design and study population

The present study consisted of a cross-sectional analysis to evaluate the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in preschool and school children from European Macaronesia, namely the archipelagos of Madeira, Azores, and the Canary Islands. Participants aged between 3 and 9 years were randomly recruited from public schools in the municipality of Câmara de Lobos (Madeira Island) and the islands of São Miguel, Faial, and Terceira, all included in the Azores archipelago, and from private schools on the island of Gran Canaria. The inclusion criteria of the children involved the written consent of the parents (according to the Helsinki Declaration), not presenting apparent disease, and being present on the day scheduled for the visit. The evaluations took place during the school years 2016/2017 (in the Madeira archipelago) and 2018/2019 (in the Azores archipelago and the Canary Islands). The effective sample size of the present study was 3481 participants, and the sample was not representative of the general population either in terms of age, gender or region.

Anthropometric parameters assessment

Trained personnel measured weight using an electronic scale, recording the value to the nearest decigram (0.1 kg), and height using a calibrated stadiometer. Stature was assessed with the children standing upright, with their backs to the stadiometer and with their feet and knees together, their heads positioned so that the gaze remained horizontal, according to the Frankfurt plane

24 anos apresentam excesso de peso, dos quais 18% são obesos (12,17), colocando-a como a comunidade autónoma com um dos maiores índices de obesidade infantil de todo o território espanhol (14,26). Mas poucos são os estudos realizados em Portugal e Espanha que avaliam a prevalência de excesso de peso (incluindo obesidade) com crianças em idade pré-escolar e escolar. Neste sentido, e tendo em consideração todos os aspetos anteriormente mencionados, o objetivo da presente análise residiu na avaliação dos dados antropométricos de uma amostra de crianças em idade pré-escolar e escolar da região conhecida como Macaronésia Europeia (Madeira, Açores e Ilhas Canárias) e posterior apreciação da prevalência de peso normal, pré-obesidade e obesidade.

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo consiste numa análise transversal com o objetivo de avaliar a prevalência de peso normal, pré-obesidade e obesidade em crianças de idade pré-escolar e escolar da Macaronésia, nomeadamente dos arquipélagos da Madeira e Açores e das Ilhas Canárias. Os participantes com idades compreendidas entre os 3 e os 9 anos foram recrutados aleatoriamente em escolas de ensino público do concelho de Câmara de Lobos (Ilha da Madeira) e das ilhas de São Miguel, Faial e Terceira, todas incluídas no arquipélago dos Açores, e em escolas de ensino privado da ilha de Gran Canaria. Os critérios de inclusão das crianças envolveram o consentimento por escrito dos encarregados de educação (de acordo com a Declaração de Helsínquia), não apresentar doença aparente e estar presente no dia agendado para a visita. As avaliações ocorreram durante os anos letivos de 2016/2017 (no arquipélago da Madeira) e 2018/2019 (no arquipélago dos Açores e nas Ilhas Canárias). O tamanho efetivo da amostra do presente trabalho foi de 3481 participantes, e a amostra não foi representativa da população geral nem em termos de idade, género ou região.

Avaliação dos dados antropométricos

O peso foi medido por profissionais treinados utilizando uma balança eletrónica, registando o valor no decígrama mais próximo (0,1 kg) e a estatura usando um estadiómetro calibrado. A estatura foi avaliada com as crianças em pé, de costas para o estadiómetro e com os pés e joelhos juntos, a cabeça posicionada para que o

(16). The value was recorded to the nearest millimeter (0.1 cm). All the participants wore lightweight clothing and no shoes during the measurements. Body Mass Index (BMI) was subsequently calculated from the measurements obtained in each child using the normalized formula [Weight (in kg)/ Height² (in m)] (17). Normal weight, overweight, and obesity were classified using the international age and gender cut-off points according to those proposed by the International Obesity Task Force (IOTF) (15).

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 χ^2 tests for categorical variables or Student's t-tests or analysis of variance (ANOVA), as appropriate, for continuous variables.

Logistical regression models were fitted to assess the associations between presenting a BMI corresponding to overweight and/or obesity cutoff (dependent variable) and gender (two categories), age (seven categories), or archipelago (three categories) as exposure. The models were adjusted for gender, age, and archipelago, except when any of these variables were the independent variable. 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 3481 individuals (1768 boys and 1713 girls) from the Azores, Madeira, and Canary Island took part in the present analysis with a mean age of 6.48 years (SD:1.96).

The general characteristics of the studied population according to gender are summarized in Table 1. No statistical differences were found regarding age, weight, and BMI in the studied population. However, height was significantly different between boys and girls, with girls being shorter.

Table 2 shows the anthropometric measurements for each age category assessed, split by gender. Boys were statistically taller than girls at age 5 (1.14 m vs. 1.12

olhar permanecesse horizontal, de acordo com o plano de Frankfurt (16). O valor foi registado no milímetro mais próximo (0,1 cm). Todos os participantes usaram roupas leves e não usaram sapatos durante todas as medições. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi posteriormente calculado a partir das medidas obtidas em cada criança, utilizando a fórmula normalizada [Peso (em kg)/Estatura² (em m)] (27). Peso normal, pré-obesidade e obesidade foram classificados usando os pontos de corte internacionais de idade e sexo, de acordo com os propostos pelo International Obesity Task Force (IOTF) (15).

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 χ^2 para variáveis categóricas ou testes t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado, para variáveis contínuas. Os modelos de regressão logística foram ajustados para avaliar as associações entre apresentar um IMC correspondente a pré-obesidade e/ou obesidade (variável dependente) e sexo (duas categorias), idade (sete categorias) ou arquipélago (três categorias) como exposição. Os modelos foram ajustados para sexo, idade e arquipélago, exceto quando qualquer uma dessas variáveis foi a variável independente. 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 3481 indivíduos (1768 rapazes e 1713 raparigas) dos arquipélagos dos Açores e da Madeira, assim como das Ilhas Canárias participaram na presente análise com uma idade média de 6,48 anos (DP:1,96).

As características gerais da população estudada de acordo com o sexo estão resumidas na Tabela 1. Não foram encontradas outras diferenças estatísticas relativamente à idade, peso e IMC na população estudada. Contudo, a estatura foi estatisticamente diferente entre rapazes e raparigas, sendo as últimas mais baixas.

A Tabela 2 mostra as medidas antropométricas para cada categoria de idade avaliada, distribuídas em função do sexo. Os rapazes foram estatisticamente mais

Table 1 - General characteristics of the study population according to gender.

Tabela 1 - Características gerais da população e estudo de acordo com o género.

	All population / População total (n=3481)	Boys / Rapazes (n=1768)	Girls / Raparigas (n=1713)	p-value ^a
Age / Idade, years / anos	6.48 (1.96)	6.49 (1.97)	6.48 (1.96)	0.851
Height / Estatura, m	1.20 (0.14)	1.20 (0.14)	1.19 (0.14)	0.008
Weight / Peso, kg	25.63 (8.80)	25.86 (8.78)	25.39 (8.81)	0.115
BMI / IMC, kg/m ²	17.44 (3.03)	17.43 (3.02)	17.44 (3.03)	0.928
Age categories / Categorias de idade, % (n)				
3 years / anos	9.80 (342)	10.00 (177)	9.60 (165)	
4 years / anos	13.80 (481)	13.10 (232)	14.50 (249)	
5 years / anos	15.20 (530)	15.40 (272)	15.10 (258)	
6 years / anos	15.00 (523)	15.70 (277)	14.40 (246)	0.867
7 years / anos	15.80 (549)	15.60 (276)	15.90 (273)	
8 years / anos	16.10 (559)	16.0 (283)	16.10 (276)	
9 years / anos	14.30 (497)	7.20 (251)	7.10 (246)	

Data expressed as means (SD) or percentages (n), as appropriate. Abbreviations: BMI, body mass index. ^aP values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson χ^2 , as appropriate.

Dados expressos como media (DP) ou percentagens (n), conforme apropriado. Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal. ^aValores de P para comparações entre grupos foram testadas através de Teste t de student ou Pearson χ^2 , conforme apropriado. .

m), 6 (1.20 m vs. 1.19 m), and 8 (1.32 m vs. 1.31 m). Additionally, boys aged 5 years old were statistically heavier than girls (21.86 kg vs. 20.84 kg) of the same age.

Female children were more overweight and obese than boys at all ages, except for overweight at age 9. Nevertheless, it should be noted that these relations were not statistically significant. However, when the analysis was performed considering the entire sample, not divided by age categories, it was found that girls were significantly more overweight (20.90% vs. 16.50%) and obese (14.10% vs. 13.00%) compared to boys (Table 3).

altos que as raparigas aos 5 anos (1,14 m vs. 1,12 m), 6 (1,20 m vs. 1,19 m) e 8 (1,32 m vs. 1,31 m). Além disso, os rapazes com 5 anos de idade foram também estatisticamente mais pesados que as raparigas (21,86 kg vs. 20,84 kg) da mesma idade.

As crianças do sexo feminino apresentaram mais excesso de peso do que os rapazes, em todas as idades, à exceção da pré-obesidade aos 9 anos de idade. No entanto, é de notar que estas relações não foram estatisticamente significativas. Contudo, quando a análise foi realizada tendo em conta toda a amostra, e não subdividida por categorias de idade, verificou-se que as raparigas apresentaram significativamente

Table 2 - Anthropometric measurements according to gender and age categories.**Tabela 2** - Medições antropométricas de acordo com o gênero e categorias de idade.

	All population / População total	Boys / Rapazes	Girls / Raparigas	p-value ^a
3 years / anos	(n=342)	(n=177)	(n=165)	
Height / Estatura	0.98 (0.06)	0.98 (0.06)	0.98 (0.06)	0.687
Weight / Peso	16.07 (2.82)	16.23 (2.77)	15.89 (2.87)	0.262
BMI / IMC	16.68 (2.02)	16.82 (2.10)	16.53 (1.93)	0.184
4 years / anos	(n=481)	(n=232)	(n=249)	
Height / Estatura	1.05 (0.06)	1.06 (0.05)	1.05 (0.07)	0.091
Weight / Peso	18.49 (3.25)	18.72 (3.29)	18.28 (3.20)	0.142
BMI / IMC	16.61 (2.28)	16.63 (2.15)	16.59 (2.39)	0.860
5 years / anos	(n=530)	(n=272)	(n=258)	
Height / Estatura	1.13 (0.06)	1.14 (0.06)	1.12 (0.06)	<0.001
Weight / Peso	21.37 (4.52)	21.86 (4.86)	20.84 (4.08)	0.009
BMI / IMC	16.70 (2.50)	16.78 (2.72)	16.62 (2.25)	0.444
6 years / anos	(n=523)	(n=277)	(n=246)	
Height / Estatura	1.19 (0.06)	1.20 (0.06)	1.19 (0.06)	0.001
Weight / Peso	24.59 (5.45)	25.00 (5.68)	24.13 (5.17)	0.068
BMI / IMC	17.10 (2.73)	17.15 (2.72)	17.05 (2.75)	0.681
7 years / anos	(n=549)	(n=276)	(n=273)	
Height / Estatura	1.25 (0.06)	1.26 (0.06)	1.15 (0.06)	0.057
Weight / Peso	27.99 (6.62)	28.16 (6.60)	27.81 (6.65)	0.537
BMI / IMC	17.65 (3.14)	17.62 (3.04)	17.68 (3.24)	0.801
8 years / anos	(n=559)	(n=283)	(n=276)	
Height / Estatura	1.31 (0.07)	1.32 (0.07)	1.31 (0.07)	0.032
Weight / Peso	31.32 (7.66)	31.25 (7.75)	31.39 (7.59)	0.831
BMI / IMC	18.05 (3.33)	17.93 (3.32)	18.17 (3.34)	0.392
9 years / anos	(n=497)	(n=251)	(n=246)	
Height / Estatura	1.37 (0.07)	1.37 (0.07)	1.36 (0.07)	0.172
Weight / Peso	35.74 (9.03)	35.76 (9.24)	35.72 (8.83)	0.962
BMI / IMC	18.99 (3.74)	18.88 (3.83)	19.10 (3.66)	0.508

Data expressed as means (SD). Height expressed in meters (m), weight in kilograms (kg), and BMI in kg/m². Abbreviations: BMI, body mass index. ^ap value for comparisons between groups were tested by Student's t-test.

Dados expressos como média (DP). Estatura expressa em metros (m), peso em quilogramas (kg), e IMC em kg/m². Abreviações: IMC, Índice de Massa Corporal. ^aValores de P para comparações entre grupos foram testadas através de Teste t de student.

Table 3 - Prevalence of normal weight, overweight, and obesity according to gender and age categories.
Tabela 3 - Prevalência de peso adequado, pré-obesidade e obesidade de acordo com o género e categorias de idade.

	All population / População total	Boys / Rapazes	Girls / Raparigas	p-value ^a
3 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	79.50 (272)	81.40 (144)	77.60 (128)	
Overweight / Pré-obesidade	14.30 (49)	13.00 (23)	15.80 (26)	0.686
Obesity / Obesidade	6.10 (21)	5.60 (10)	6.70 (11)	
4 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	73.00 (351)	75.90 (176)	70.30 (175)	
Overweight / Pré-obesidade	15.60 (75)	13.80 (32)	17.30 (43)	0.385
Obesity / Obesidade	11.40 (55)	10.30 (24)	12.40 (31)	
5 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	70.00 (371)	73.20 (199)	66.70 (172)	
Overweight / Pré-obesidade	15.70 (83)	12.90 (35)	18.60 (48)	0.163
Obesity / Obesidade	14.30 (76)	14.00 (38)	14.70 (38)	
6 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	65.60 (343)	68.60 (190)	62.20 (153)	
Overweight / Pré-obesidade	19.70 (103)	17.00 (47)	22.80 (56)	0.216
Obesity / Obesidade	14.70 (77)	14.40 (40)	15.00 (37)	
7 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	65.50 (360)	68.80 (190)	62.30 (170)	
Overweight / Pré-obesidade	18.60 (102)	15.20 (42)	22.00 (60)	0.117
Obesity / Obesidade	15.80 (87)	15.90 (44)	15.80 (43)	
8 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	64.60 (361)	66.40 (188)	62.70 (173)	
Overweight / Pré-obesidade	21.80 (122)	21.20 (60)	22.50 (62)	0.594
Obesity / Obesidade	13.60 (76)	12.40 (35)	14.90 (41)	
9 years / anos				
Normal Weight / Peso adequado	61.00 (303)	63.70 (160)	58.10 (143)	
Overweight / Pré-obesidade	23.30 (116)	21.10 (53)	15.60 (63)	0.403
Obesity / Obesidade	15.70 (78)	15.10 (38)	16.30 (40)	
TOTAL				
Normal Weight / Peso adequado	67.80 (2361)	70.50 (1247)	65.00 (1114)	
Overweight / Pré-obesidade	18.70 (650)	16.50 (292)	20.90 (358)	0.001
Obesity / Obesidade	13.50 (470)	13.00 (229)	14.10 (241)	

Data expressed as percentages (n). ^a p values for comparisons between groups were tested by Pearson χ^2 . ^b Normal weight, overweight, or obesity were categorized according to IOTF criteria(15).
 Dados expressos como percentage (n). ^aValores de P para comparações entre grupos foram testadas através de Pearson χ^2 . ^bPeso adequado, pré-obesidade ou obesidade foram categorizados de acordo com os critérios da IOTF(15).

Table 4 - Association (Odds ratio) between presenting overweight and/or obesity and gender or age categories or archipelago.**Tabela 4** - Associação (Odds Ratio) entre apresentar excess de peso (pré-obesidade e obesidade) e género ou idade ou arquipélago.

Variables	All population / População total (n=3481)	Boys / Rapazes (n=1768)	Girls / Raparigas (n=1713)
Gender / Género ^a	1.29 (1.12-1.49)	-	-
Age categories / Categorias de idade			
3 years / anos	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
4 years / anos	1.41 (1.01-1.96)	1.36 (0.84-2.21)	1.45 (0.92-2.29)
5 years / anos	1.62 (1.17-2.24)	1.55 (0.97-2.46)	1.69 (1.08-2.65)
6 years / anos	2.03 (1.47-2.80)	1.95 (1.23-3.08)	2.11 (1.35-3.31)
7 years / anos	2.02 (1.47-2.78)	1.94 (1.23-3.07)	2.10 (1.35-3.26)
8 years / anos	2.12 (1.54-2.91)	2.19 (1.39-3.46)	2.05 (1.32-3.19)
9 years / anos	2.44 (1.77-3.37)	2.46 (1.55-3.90)	2.44 (1.56-3.81)
Archipelago / Arquipélago			
Canary Island / Ilhas Canárias	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Azores / Açores	1.31 (1.08-1.59)	1.35 (1.02-1.78)	1.27 (0.97-1.67)
Madeira / Madeira	1.36 (1.16-1.62)	1.42 (1.10-1.83)	1.30 (1.02-1.67)

Data expressed as ORs (95% Confidence Interval). ^a Gender was coded as 0 for boys and 1 for girls. Logistic regression model adjusted for gender, age, and archipelago (except when gender or age was the independent variable).

Dados expressos como ORs (Intervalo de Confiança de 95%). ^a Género codificado como 0 para rapazes e 1 para raparigas. Modelo da regressão logística ajustado por género, idade e arquipélago (exceto quando género, idade e arquipélago foram a variável independente).

The odds ratio of presenting BMI corresponding to overweight and obesity according to IOTF children cutoff (Table 4) were significantly higher for girls and participants at age 4, 5, 6, 7, 8, and 9 years old in the full-adjusted model. When the comparison was performed according to gender, it was found that boys older than 6 years old and girls older than 5 years old presented a higher probability of being overweight and/or obese. In the same line of analysis, an odds ratio analyses was also conducted according to the archipelago of residence. Children from Azores and Madeira presented a higher risk of being overweight and/or obese, taking into consideration Canary Island as a reference. When the analysis was performed divided by gender, it was noted

mais pré-obesidade (20,90% vs. 16,50%) e obesidade (14,10% vs. 13,00%) em comparação com os rapazes. Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.

A Odds Ratio de apresentar IMC correspondente a excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) de acordo com os critérios da IOTF (Tabela 4) foi significativamente mais elevada com o facto de ser rapariga, e assim como com o facto de ter 4, 5, 6, 7, 8 e 9 anos de idade, no modelo totalmente ajustado. Quando a comparação foi efetuada de acordo com o sexo, verificou-se que os rapazes com mais de 6 anos e as raparigas com mais de 5 anos apresentavam uma maior probabilidade de apresentarem excesso de peso.

that boys from Madeira and Azores, and only girls from Madeira presented a higher probability [1.30 (1.02-1.67)] of presenting BMI over the recommendations.

These findings were consistent with previous reports (8,16,17) indicating that girls had a higher prevalence of overweight (including obesity) in early childhood. Regarding the prevalence of overweight and/or obesity as a function of the location of individuals, several studies have described that some of the highest levels of obesity in the world are found in island populations (18–22), as is the case in the Azores, Madeira and Canary Islands. These results can be explained by a number of factors, including low levels of physical activity and a decrease in consumption of traditional, fresh, local island foods, such as fish, meat, and fruits and vegetables, which have been replaced by a high energy density diet (22). However, to the best of our knowledge this publication is the first to describe this data and to evaluate exclusively anthropometric data in children aged between 3 and 9 years in the archipelagos of Madeira, Azores and Canary Islands. More studies are needed, however, to better understand the sociodemographic variables that could explain the results obtained. The present study was not focused or integrated with the evaluation of explanatory variables, therefore, future studies are necessary to clarify the behaviors that can trigger this condition. In this view, an inherent limitation to this study include the fact that lifestyle behaviors (eating habits, physical activity, and sedentary behaviors) of the children were not evaluated (23). Additionally, it was not possible to collect data in Cape Verde for their integration and processing in the current study. These results emphasize the importance of educational strategies and intervention measures at early ages that contribute to effective control of childhood obesity, reducing its rates (24,25).

Na mesma linha de investigação, foi também realizada a análise de odds ratio de acordo com o arquipélago de residência. As crianças dos Açores e da Madeira apresentaram um risco mais elevado de apresentar excesso de peso, tendo em consideração as Ilhas Canárias como referência. Quando a análise foi dividida por sexo, notou-se que os rapazes da Madeira e dos Açores e apenas as raparigas da Madeira apresentavam maior probabilidade [1,30 (1,02-1,67)] de apresentar IMC superior às recomendações.

Estas conclusões foram condizentes com outros relatórios anteriores (8,16,17) nos quais os autores descreveram que as raparigas apresentaram maior prevalência de excesso de peso (incluindo obesidade) na primeira infância. Em relação à prevalência de excesso de peso e/ou obesidade em função da localização dos indivíduos, tem sido descrito em diversos estudos que alguns dos níveis mais elevados de obesidade no mundo são encontrados em populações insulares (18–22), como é o caso dos Açores, Madeira e Canárias. Esses resultados podem ser explicados por uma série de fatores, incluindo baixos níveis de atividade física e uma diminuição no consumo de alimentos tradicionais, frescos e locais das ilhas, como peixe, carne e frutas e legumes, que foram substituídos por uma dieta com uma alta densidade energética (22). Contudo, até onde se sabe, a presente publicação é a primeira a descrever este dado e a avaliar exclusivamente dados antropométricos em crianças com idades compreendidas entre os 3 e os 9 anos nos arquipélagos da Madeira, Açores e Ilhas Canárias. Contudo, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão das variáveis sociodemográficas que poderiam explicar os resultados obtidos. O foco do presente trabalho não se centrava nem integrava a avaliação de variáveis explicativas, sendo por isso necessários estudos futuros que visem esclarecer os comportamentos que podem desencadear esta condição, atendendo a que a avaliação dos comportamentos de estilo de vida das crianças que incluem os hábitos alimentares, a atividade física e os comportamentos sedentários não foram avaliados, constituindo limitações inerentes a este estudo (23), bem como o facto de não ter sido possível recolher dados em Cabo Verde para a integração e processamento dos mesmos no corrente estudo. Estes resultados enfatizam a importância da existência de estratégias educativas e de medidas interventivas em idades precoces que contribuam para um controlo efetivo da obesidade infantil, reduzindo as suas taxas (24,25).

Conclusion

The results obtained at the present work revealed a significantly higher prevalence of overweight and obesity in female participants of almost all ages analyzed and residents of the Azores and Madeira archipelago. These findings expose the need for better and new educational strategies, public health policies, and interventional measures at early ages in a way to contribute to effective control of childhood obesity worldwide.

Authors Contributions Statement

N.T. conceptualization and study design; N.T. experimental implementation and data collection; C.F.-P. data analysis; N.T., T.S., C.F.-P. drafting, editing, and reviewing; C.F.-P. tables; N.T., C.F.-P. supervision and 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.

Acknowledgments

The authors would like to express thanks to all participants in the study.

Conflict of Interests

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

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram uma prevalência significativamente mais elevada de pré-obesidade e obesidade em participantes do sexo feminino de quase todas as idades analisadas e residentes no arquipélago dos Açores e da Madeira. Estes resultados expõem a necessidade de melhores e novas estratégias educativas, políticas de saúde pública, e medidas de intervenção em idades precoces, de modo a contribuir para o controlo efetivo da obesidade infantil em todo o mundo.

Declaração sobre as contribuições do autor

N.T., conceitualização e conceção do estudo; N.T., implementação experimental e recolha de dados; C.F.-P., análise de dados; N.T., T.S., C.F.-P. redação, edição e revisão; C.F.-P. tabelas; N.T., C.F.-P. supervisão e 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.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos a todos os participantes no estudo.

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. Soares, L.D., Petroski, E.L. (2003) Prevalência, fatores etiológicos e tratamento da obesidade infantil. *Revista brasileira de cineantropometria & desempenho humano*, 5(1):63–74. <https://periodicos.ufsc.br/index.php/rbcdh/article/view/4008>.
2. Kumar, S., & Kelly, A. S. (2017). Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clinic proceedings*, 92(2), 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.017/>
3. Güngör, N. K. (2014). Overweight and obesity in children and adolescents. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 6(3), 129–143. <https://doi.org/10.4274/Jcrpe.1471>
4. Nittari, G., Scuri, S., Petrelli, F., Pirillo, I., di Luca, N. M., & Grappasonni, I. (2019). Fighting obesity in children from European World Health Organization member states. Epidemiological data, medical-social aspects, and prevention programs. *La Clinica terapeutica*, 170(3), e223–e230. <https://doi.org/10.7417/CT.2019.2137/>
5. Rito, I., Graça, P. Childhood Obesity Surveillance Initiative: relatório COSI Portugal 2013 [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 21] p. 36. Available from: <https://www.insa.min-saude.pt/relatorio-childhood-obesity-surveillance-initiative-cosi-portugal-2013/>
6. Gouveia, É., Freitas, D., Maia, J., Beunen, G., Claessens, A., Marques, A., Thomis, M., Almeida, S., Lefevre, J. (2009). Prevalência de sobrepeso e de obesidade em crianças e adolescentes na Região Autónoma da Madeira, Portugal. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 40(6), 245–251. <https://digituma.uma.pt/handle/10400.13/1313?locale=en>
7. Freitas, D., Beunen, G., Maia, J., Claessens, A., Thomis, M., Marques, A., Gouveia, E., & Lefevre, J. (2012). Tracking of fatness during childhood, adolescence and young adulthood: a 7-year follow-up study in Madeira Island, Portugal. *Annals of human biology*, 39(1), 59–67. <https://doi.org/10.3109/03014460.2011.638322>.
8. Rito, A., Wijnhoven, T. M., Rutter, H., Carvalho, M. A., Paixão, E., Ramos, C., Claudio, D., Espanca, R., Sancho, T., Cerqueira, Z., Carvalho, R., Faria, C., Feliciano, E., & Breda, J. (2012). Prevalence of obesity among Portuguese children (6–8 years old) using three definition criteria: COSI Portugal, 2008. *Pediatric obesity*, 7(6), 413–422. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00068.x>
9. Wijnhoven, T. M., van Raaij, J. M., Spinelli, A., Rito, A. I., Hovengen, R., Kunesova, M., Starc, G., Rutter, H., Sjöberg, A., Petrauskiene, A., O'Dwyer, U., Petrova, S., Farrugia Sant'Angelo, V., Wauters, M., Yngve, A., Rubana, I. M., & Breda, J. (2013). WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative 2008: weight, height and body mass index in 6–9-year-old children. *Pediatric obesity*, 8(2), 79–97. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00090.x>
10. Freitas, A. I., Moreira, C., & Santos, A. C. (2019). Time trends in prevalence and incidence rates of childhood overweight and obesity in Portugal: Generation XXI birth cohort. *International journal of obesity (2005)*, 43(2), 424–427. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0286-8>
11. Ferreira-Pêgo, C., Carrapa, A., Gaipo, S., Parece, T., Marinho, R., Dias, T., Viveiros, F., Carvalho, R., César, R., Tavares, N. (2019) Anthropometric evaluation of pre-school and school age children from Azores archipelago, Portugal. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 16(2): 165–175. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-16-2-2019/Art2.pdf>
12. Ferreira-Pêgo, C., Galván, E., Morales, S., Fábregas, J., Martín, Y., Tavares, N. (2019) Anthropometric evaluation of children aged between 3 and 9 years from Canary Island. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 16(2):153–64. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-16-2-2019/Art1.pdf>
13. Pérez-Rodrigo, C., Aranceta Bartrina, J., Serra Majem, L., Moreno, B., & Delgado Rubio, A. (2006). Epidemiology of obesity in Spain. Dietary guidelines and strategies for prevention. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 76(4), 163–171. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.76.4.163>.
14. Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Aranceta Bartrina, J., Pérez Rodrigo, C., Saavedra Santana, P., & Peña Quintana, L. (2003). Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998–2000) [Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998–2000)]. *Medicina clinica*, 121(19), 725–732. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(03\)74077-9](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(03)74077-9).
15. Cole, T. J., Bellizzi, M. C., Flegal, K. M., & Dietz, W. H. (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ (Clinical research ed.)*, 320(7244), 1240–1243. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7244.1240>.
16. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., ... Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, 384(9945), 766–781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
17. Rito, A. I., Paixão E., Carvalho M. A., Ramos, C. (2011) Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2008. <http://hdl.handle.net/10400.18/142>
18. Garza, J. R., Pérez, E. A., Prelip, M., McCarthy, W. J., Feldman, J. M., Canino, G., & Ortega, A. N. (2011). Occurrence and correlates of overweight and obesity among island Puerto Rican youth. *Ethnicity & disease*, 21(2), 163–169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749019>.
19. Athanasopoulos, D. T., Garopoulou, A. I., & Dragoumanos, V. P. (2011). Childhood obesity and associated factors in a rural Greek island. *Rural and remote health*, 11(4), 1641.
20. Schwiebbe, L., van Rest, J., Verhagen, E., Visser, R. W., Holthe, J. K., & Hirasing, R. A. (2011). Childhood obesity in the Caribbean. *The West Indian medical journal*, 60(4), 442–445.
21. Grech, V., & Farrugia Sant'Angelo, V. (2009). Body mass index estimation in a school-entry aged cohort in Malta. *International journal of pediatric obesity : IJPO : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 4(2), 126–128. <https://doi.org/10.1080/17477160802464487>
22. Curtis M. (2004) The Obesity Epidemic in the Pacific Islands. *Journal of Development and Social Transformation*, 1:37–42. .
23. Ferreira, M., Faria, V., Sousa, B., Tavares, N. (2019) Evaluation of the nutritional status in pre-school and school children, Madeira Island, Portugal. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 16(1):8–18. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-16-1-2019/art1.pdf>
24. Pereira, S. A., Seabra, A. T., Silva, R. G., Katzmarzyk, P. T., Beunen, G. P., & Maia, J. A. (2010). Prevalence of overweight, obesity and physical activity levels in children from Azores Islands. *Annals of human biology*, 37(5), 682–691. <https://doi.org/10.3109/03014461003639223>
25. Penilla, C., Tschann, J. M., Sanchez-Vaznaugh, E. V., Flores, E., & Ozer, E. J. (2017). Obstacles to preventing obesity in children aged 2 to 5 years: Latino mothers' and fathers' experiences and perceptions of their urban environments. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*, 14(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12966-017-0605-9>.
26. Pérez-Rodrigo, C., Aranceta Bartrina, J., Serra Majem, L., Moreno, B., & Delgado Rubio, A. (2006). Epidemiology of obesity in Spain. Dietary guidelines and strategies for prevention. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 76(4), 163–171. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.76.4.163>.
27. Madden, A. M., Tsikoura, T., & Stott, D. J. (2012). The estimation of body height from ulna length in healthy adults from different ethnic groups. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*, 25(2), 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2011.01217.x>

Food insecurity in the households of the Algarve

Insegurança Alimentar em Agregados Familiares no Algarve

Ezequiel Pinto ^{1,2*}, Filipa Guerreiro ^{1,2,3}, Artur Gregório ³, Maria Palma Mateus ^{1,2}

¹Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, Edifício 1, Piso 1, 8005-139, Faro, Portugal; ²Escola Superior de Saúde - Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, Edifício 1, Piso 1, 8005-139, Faro, Portugal; ³Associação *In Loco*, Av. da Liberdade 101, 8150-101 São Brás de Alportel, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: epinto@ualg.pt

Abstract

The National Health Directorate considered that an assessment of food insecurity was a priority for the Algarve region. This study reports the results of the Regional Observatory for Food Security, which aimed to identify socioeconomic determinants, lifestyle risk factors, and prevalence of food insecurity in the Algarve.

We conducted a cross-sectional study in a random, stratified, sample of households in the Algarve, with data regarding sociodemographic, anthropometric, food insecurity, access to places where food is sold, and Mediterranean diet adherence variables, collected through a direct interview conducted to a representative of the household. Data analysis was conducted with the IBM-SPSS software, version 22.

Approximately 24% of households had mild food insecurity, 3% had moderate food insecurity, and 2% had severe food insecurity. Only 25% of participants had good adherence to the Mediterranean Diet. Unemployment in the household ($r_{\text{Spearman}}=0.116$; $p<0.05$), smoking habits ($r_{\text{Spearman}}=0.193$; $p<0.05$), and low adherence to Mediterranean Diet ($\chi^2=6.7$; $p=0.01$) seem associated with greater food insecurity. An odds ratio analysis shows that having a higher education degree can be a protective factor for food insecurity (OR=0.78; 95%IC 0.66-0.92).

Although further studies are needed in order to assess in detail the determinants of food insecurity, this work can contribute to tailor food and nutrition interventions in the region.

Keywords: Algarve; Food Insecurity; Mediterranean Diet

Resumo

O Observatório Regional da Segurança Alimentar levou a cabo a primeira avaliação da insegurança alimentar em agregados familiares do Algarve, com o objetivo de caracterizar a insegurança alimentar na região e identificar determinantes socioeconómicos e de estilo de vida associados. Realizou-se um estudo transversal numa amostra aleatória estratificada de agregados familiares, com inquirição por entrevista direta a um interlocutor de cada agregado. Recolheu-se informação sociodemográfica, antropométrica, sobre insegurança alimentar e sobre adesão ao padrão alimentar mediterrânico. Analisou-se os dados com o software IBM-SPSS, versão 22. A amostra final foi composta por 384 representantes dos agregados. Cerca de 24% dos agregados apresentava insegurança alimentar ligeira, 3% apresentava insegurança alimentar moderada e 2% apresentava insegurança alimentar grave. Apenas 25% dos agregados apresentou adesão ao padrão alimentar mediterrânico. O desemprego no agregado familiar, a existência de hábitos tabágicos e a baixa adesão ao padrão alimentar mediterrânico parecem estar associados a maior insegurança alimentar ($p<0,005$). A instrução a nível do Ensino Superior pode ser um fator protetor para a insegurança alimentar (OR=0,78, IC95% 0,66-0,92). Ainda que sejam necessários estudos futuros sobre determinantes da insegurança alimentar, este trabalho pode contribuir para ajustar as metodologias de intervenção nesta área às características dos agregados familiares do Algarve.

Palavras-chave: Algarve; Insegurança Alimentar; Dieta Mediterrânica.

Introduction

The Food and Agriculture Organisation (FAO) describes food security (FS) as a situation in which all people, at all times, have permanent physical, social, and economic access to sufficient, safe and nutritious food to meet their dietary needs and food preferences for an active and healthy life (1). This concept encompasses four distinct dimensions that must occur simultaneously: the availability of food, physical and economic access to food, the stability of food, and the use of food in the diet.

Food insecurity (FI), the opposite of FS, is defined as a situation in which a consumer's physical, social and economic access to nutritionally adequate food is scarce or non-existent. It is a global public health problem, gaining expression on political health agendas worldwide, highly prevalent in developing countries, but also a concern in countries with developed economies (2). It is associated with unhealthy eating habits, obesity, and non-communicable diseases (NCD), in addition to conditions of undernourishment and undernutrition (3,4).

According to FAO, in 2017, about 821 million people were affected by malnutrition or chronic food shortages, and the average prevalence of severe FI was 9.2% globally and 1.6% in the European Union (5). Non-communicable chronic diseases account for 38 million or 70% of deaths worldwide, with 28 million of all deaths occurring in low- and middle-income countries, and 82% of 16 million premature deaths (6).

The Mediterranean diet (MD) has been shown to be a healthy dietary pattern, associated with a lower risk for several NCD (7). It is characterized by a high intake of local and seasonal healthy plant foods, and a moderate intake of red meat and dairy (7,8).

MD is not only associated with nutritional and health benefits but also with economic and environmental benefits that can contribute to halving (at minimum) greenhouse gas emissions from the food system compared to current western diets (7–9).

Issues related to the sustainability of the diets, environmental impact of food systems, and climate changes are increasingly relevant, as they contribute to aggravating the vulnerability and food insecurity of populations (6,9). However, a decreasing trend in adherence to MD in Mediterranean populations has been observed (10).

Introdução

A segurança alimentar (SA) é descrita pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) como uma “situação na qual todas as pessoas, em qualquer momento, têm acesso físico, social e económico permanente a alimentos seguros, nutritivos e em quantidade suficiente para satisfazer suas necessidades nutricionais e preferências alimentares, tendo assim uma vida ativa e saudável” (1). Este conceito engloba quatro dimensões distintas que devem ocorrer simultaneamente: a disponibilidade dos alimentos, o acesso físico e económico aos alimentos, a estabilidade dos alimentos e o uso dos alimentos na dieta alimentar.

A insegurança alimentar (IA), o oposto da SA, é definida como uma situação em que o acesso físico, social e económico do consumidor a alimentos adequados sob o ponto de vista nutricional é escasso ou inexistente. É um problema de saúde pública à escala mundial, com expressão crescente nas agendas políticas de saúde a nível mundial, altamente prevalente nos países em desenvolvimento, mas também uma preocupação em países economicamente desenvolvidos (2). A IA está associada a hábitos alimentares não saudáveis e doenças crónicas (DC), para além de situações de subnutrição (3,4).

Segundo a FAO, em 2017, cerca de 821 milhões de pessoas foram afetadas pela desnutrição ou pela carência crónica de alimentos e a prevalência média para a IA grave era de 9,2% a nível global e 1,6% na União Europeia (5). As DC são responsáveis por 38 milhões de mortes a nível mundial, com 28 milhões de todas as mortes a ocorrerem em países com baixo e médio rendimento económico, e responsáveis também por 16 milhões de mortes prematuras (6).

A Dieta Mediterrânica (DM), caracterizada por um aporte elevado de alimentos de origem vegetal, de produção local e respeitantes da sazonalidade, e de um aporte moderado de carnes vermelhas e laticínios (7,8), tem-se revelado um padrão alimentar saudável, associado com uma incidência mais baixa de várias DC (7). A DM está também associada a vantagens económicas e ambientais que podem contribuir para reduzir em pelo menos metade as emissões de gases promotores de efeito de estufa, quando comparada com as dietas ocidentais mais comuns atualmente (7–9).

As questões relacionadas com a sustentabilidade das dietas e as alterações climáticas são cada vez mais relevantes, pois as dietas desadequadas podem contribuir para agravar a vulnerabilidade e a IA da

In Portugal, the scientific literature on this subject is scarce. Between 2011 and 2014, the General Directorate of Health (DGS) coordinated a nationwide study - INFOFAMÍLIA study - which aimed to contribute to the improvement of the methodology to evaluate FI and to assess FI in a representative sample of households in mainland Portugal.

Between 48.5% and 50.7% of households were classified as being in a status of FI. Higher rates were identified in the regions of Algarve and Lisbon and Tagus Valley (11).

Following these results, the DGS considered the assessment and monitoring of FI in the Algarve region a priority, which led the IN LOCO Association to develop a pilot project in the region, aimed at assessing and monitoring the state of FI in the Algarve population, and at implementing a “Regional Observatory for Food Security”.

This project was funded by the DGS and ran between August of 2017 and August of 2018. This paper reports some of the data collected by the Regional Observatory for Food Security and aims to describe FI in the Algarve and analyse associated socio-economic and lifestyle determinants.

Materials and Methods

Population and sample

The Algarve is a coastal region in the south of Portugal, with around 467,500 permanent inhabitants, and incorporates 16 municipalities, subdivided into 67 counties. Based on demographic statistics for the region and following the methods proposed by Cohen (12), we estimated that a minimum of 199 households were needed to construct a representative sample of the prevalence of FI reported by the INFOFAMÍLIA study (11) for the region, considering a sample power of 80% and a statistical significance of 0.05. With information provided by the municipalities and demographic data for the region, we constructed a random sampling of households, stratified by categories of populational density. We set the minimum number of households (to be participate) from each county at 5 in order to assure representation. This would imply a minimum of 335 households to represent the region. We randomly selected and contacted 400 households. A total of 384 representatives of the household were willing to be a part of this study.

população (6,9). Contudo, apesar das duas vantagens, tem-se registado uma tendência para um decréscimo da adesão à DM em populações mediterrânicas (10).

A produção científica em Portugal sobre o assunto parece ser reduzida. Entre 2011 e 2014 realizou-se o estudo INFOFAMÍLIA, coordenado pela Direção Geral de Saúde (DGS), que teve, entre outros objetivos: contribuir para melhorar a metodologia de avaliação e monitorização da situação de IA e avaliar esta situação numa amostra de agregados familiares em Portugal Continental, utentes dos cuidados de saúde primários do Serviço Nacional de Saúde. Identificou-se uma prevalência de agregados familiares em situação de IA entre 48,5% e 50,7%, com as regiões de saúde do Algarve e de Lisboa e Vale do Tejo a apresentar um risco de IA mais elevado (11).

Na sequência destes resultados, a DGS considera prioritária a avaliação e monitorização da IA na região do Algarve, o que levou a Associação IN LOCO a desenvolver um projeto-piloto na região, que permita avaliar e monitorizar o estado de SA da população algarvia e implementar na região um “Observatório Regional da Segurança Alimentar”. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar a situação de IA no Algarve e investigar determinantes socioeconómicos e de estilo de vida associados.

Material e Métodos

População-alvo e amostra

Com base na informação demográfica disponível para o Algarve, estimou-se, através da metodologia proposta por Cohen (12), que seria necessária uma amostra mínima de 199 agregados familiares, de forma a representar, com 80% de potência e considerando um nível de significância de 5%, os resultados para IA obtidos no estudo INFOFAMÍLIA (11). Através da informação demográfica disponível e de informação obtida junto das autarquias da região, construiu-se uma amostra de agregados familiares em cada freguesia do Algarve, estratificada por densidade populacional, através de uma seleção aleatória, anónima, de agregados, que foram contactados diretamente para convite à participação no estudo. Nas freguesias com densidade populacional mais baixa definiu-se a recolha, no mínimo, de cinco agregados. Considerando a existência de 67 freguesias na região, definiu-se um mínimo de 335 agregados como amostra representativa da região. Selecionou-se 400 agregados familiares aleatoriamente, de modo

Data collection

A survey was conducted through direct interview of one representative for each household, a habitual resident (tourists and temporary residents were not considered as valid representatives of the household), aged 18 years old or older.

The interview script consisted of a structured questionnaire, based on the survey tool of the INFOFAMILIA study, and was composed of four sections: 1) sociodemographic and anthropometric characterization; 2) FI scale; 3) questions regarding alcohol intake and regarding conditions of accessing places where food is sold; and 4) adherence to the Mediterranean dietary pattern (MDP).

The FI scale used in the INFOFAMÍLIA study (11) and reproduced in this study was proposed in 2014 by Gregório et al. (13), based on the “Brazilian Scale of Food Insecurity” (14), originally developed by the United States Department of Agriculture (15). This scale is composed of 14 close-ended questions and provides a final score between 0 and 14 points, which allows the classification of FI in three levels: Mild FI (1 to 5 points in households with underaged elements or 1 to 3 points in households composed exclusively by adults) – Concern or Uncertainty as to future access to food or as to inadequate food quality resulting from strategies aiming at not compromising the quantity of food; Moderate FI (6 to 9 points in households with underaged elements or 4 to 5 points in households composed exclusively of adults) – Quantitative reduction of food among adults or disruption in the dietary patterns resulting from lack of food among adults and Severe FI (10 to 14 points in households with underaged elements or 6 to 8 points in households composed exclusively of adults) – Quantitative reduction of food among children or disruption in eating patterns resulting from the lack of food among children; famine (when someone goes an entire day without eating due to lack of money to purchase food).

The assessment of adherence to MDP was performed using a Portuguese version of the Mediterranean Diet Adherence Screener scale (MEDAS) used in the PREDIMED study (11). This scale presents 14 questions to which a score is attributed. Total score can vary between 0 and 14, and scores equal to or greater than 10 are considered indicative of good adherence to MDP (16). For use in Portugal, the items of the Brazilian version were adapted in their spelling and grammar by a panel of experts and pre-tested.

a garantir que eventuais recusas na participação não comprometessem a dimensão da amostra. Aceitaram participar no estudo os representantes de 384 agregados.

Instrumentos de recolha de dados

Realizou-se uma inquirição através de entrevista direta a um interlocutor do agregado familiar, residente habitual (turistas e residentes temporários não foram considerado como interlocutores válidos), com idade igual ou superior a 18 anos. O guião de entrevista consistiu num questionário estruturado, baseado na ferramenta de inquirição do estudo INFOFAMÍLIA, e foi composto por quatro seções: 1) caracterização sociodemográfica e antropométrica; 2) escala de IA; 3) questões sobre consumo de álcool e sobre condições de acesso a comércio de alimentos; 4) adesão ao padrão alimentar mediterrânico (PAM).

A escala de IA utilizada no estudo INFOFAMÍLIA (11) e reproduzida na presente investigação foi proposta em 2014 por Gregório e colaboradores (13), tendo por base a escala “Escala Brasileira de Insegurança Alimentar” (14), por sua vez uma tradução da escala em língua inglesa originalmente desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (15). A escala de IA é composta por 14 questões de resposta fechada e atribui uma pontuação final entre 0 e 14 pontos. A pontuação final classifica a IA em três níveis: IA Ligeira (1 a 5 pontos para agregados com menores de idade ou 1 a 3 pontos para agregados só com adultos) - Preocupação ou incerteza quanto ao acesso aos alimentos no futuro ou quanto à qualidade inadequada dos alimentos resultante de estratégias que visam não comprometer a quantidade de alimentos; IA Moderada (6 a 9 pontos para agregados com menores de idade ou 4 a 5 pontos para agregados só com adultos) - Redução quantitativa de alimentos entre os adultos ou rutura nos padrões de alimentação resultante da falta de alimentos entre os adultos; IA Grave (10 a 14 pontos para agregados com menores de idade ou 6 a 8 pontos para agregados só com adultos) - Redução quantitativa de alimentos entre as crianças ou rutura nos padrões de alimentação resultante da falta de alimentos entre as crianças; fome (quando alguém fica um dia inteiro sem comer por falta de dinheiro para comprar alimentos). Para utilização em Portugal, os itens da versão brasileira foram adaptados na sua grafia e gramática por um painel de peritos e alvo de pré-teste

A avaliação da adesão ao PAM foi realizada através de uma versão portuguesa da escala “Mediterranean Diet Adherence Screener” (MEDAS) utilizada no estudo PREDIMED (11). Esta escala apresenta catorze

Self-reported weight and height were used to calculate the body mass index (BMI) of the participants, which was categorized in order to classify nutritional status according to the World Health Organization criteria: BMI < 18,50 kg/m² represents “Low weight”, BMI between 18,50 and 24,99 kg/m² represents “Normal weight”, BMI ≥ 25,00 kg/m² represents “Overweight” and where BMI ≥ 30,00 kg/m² represents “Obesity” (17).

This study was submitted to and approved by an institutional Ethics Committee and all ethical issues underlying this type of study were followed, in accordance with the principles established by the Declaration of Helsinki (18), as well as all appropriate rules of confidentiality and data protection. The study design, the procedures for anonymity and confidentiality, the informed consent, and all survey methodology was analyzed by the jury of the application process for funding. The application resulted in authorization for the study and funding, granted by the DGS.

Statistical analysis

The data collected in this study were used to build a database in Microsoft Office Excel 2007[®] and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 22[®].

Descriptive statistical procedures were used, and mean values and standard deviations were calculated for quantitative variables; absolute and relative frequencies were determined for each category of nominal and ordinal variables, considering the total number of valid answers. Data were also summarized using tables.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify adherence to the Normal distribution for the variables used in statistical inference tests and, according to the results of the test for adherence to the Normal distribution, the Student's t-test was used for comparison of two groups in variables with a distribution considered Normal and the Mann-Whitney test in variables with another distribution. The associations between variables with Normal distribution were studied through Pearson's correlation coefficient and Spearman's correlation coefficient was used as its non-parametric equivalent.

questões, às quais é atribuída uma pontuação, que pode variar entre 0 e 14, onde as pontuações são iguais ou maior que 10 foram considerados indicativos de boa adesão ao PAM (16).

Utilizou-se o peso e a altura autorreportados para calcular o índice de massa corporal (IMC) dos participantes, que foi categorizado para a classificação do estado nutricional de acordo com os critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde, onde: IMC < 18,50 kg/m² representa “Baixo peso”, IMC entre 18,50 e 24,99 kg/m² representa “Peso Normal”, IMC ≥ 25,00 kg/m² representa “Pré-obesidade” e onde IMC ≥ 30,00 kg/m² representa “Obesidade” (17).

Submeteu-se o protocolo deste estudo a Comissão de Ética institucional e seguiram-se todas as questões éticas subjacentes a este tipo de estudo, de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia (18), bem como todas as normas de confidencialidade e proteção de dados. Adicionalmente, o desenho de estudo deste trabalho, os procedimentos de anonimização e confidencialidade da informação, a redação do consentimento informado que foi disponibilizado a todos os participantes e a metodologia de inquirição deste projeto, foram analisados pelo júri do processo de candidatura a financiamento da DGS. Esta candidatura teve parecer positivo e atribuição de financiamento e autorização para a realização do estudo.

Análise estatística

Os dados recolhidos neste estudo foram utilizados para construção de uma base de dados nos programas Microsoft Office Excel 2007[®] e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22[®].

Utilizaram-se procedimentos de estatística descritiva e calcularam-se valores médios e desvios padrão para as variáveis quantitativas; determinaram-se as frequências absolutas e relativas para cada categoria das variáveis nominais e ordinais, tendo em conta o número total de respostas válidas, excluindo os dados omissos. Sumarizaram-se também os dados através de tabelas.

Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a adesão à distribuição Normal para as variáveis utilizadas em testes de inferência estatística e, de acordo com os resultados do teste de adesão à distribuição Normal, utilizou-se o teste t de Student para comparação de dois grupos em variáveis com distribuição considerada Normal e o teste de Mann-Whitney em variáveis com outra distribuição. Estudaram-se as associações entre variáveis com

The chi-square test was used to analyse associations between qualitative variables and the unadjusted association between the variables under study, and AI status was studied by calculating the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95%CI), estimated through univariate logistic regression. A significance of 0.05 was considered as an indicator of statistically significant differences or associations in all the tests conducted.

Results

The final sample was composed of 384 participants, 24% (n=91) male and 76% (n=293) female, aged between 18 and 97 years (M=56.4; SD=17.76). The most common formal education level of the participants was the first level of basic education, corresponding to up to four years of schooling (31.3%; n=120). Most of the households (38.2%; n=146) were composed of only two people and more than half of the households (55.7%; n=214) did not include individuals over 65 years old.

Using BMI as an indicator of nutritional status, 40.6% of participants were overweight and 16.8% of participants were classified as obese.

Most participants reported that they usually buy food for the household (90.9%), cook meals (85.4%) and use olive oil to do so (97.7%).

Approximately 29% of participants (n=113) had some degree of FI and 2.1% (n=8) had severe FI. The results of the items of the FS scale and the prevalence of FI are presented in Table 1.

FI appeared to be associated with a decrease in the consumption of essential foods ($X^2=64.2$; $p<0.001$), the purchase of medicines ($X^2=36.6$; $p<0.001$), the number of visits to the doctor ($X^2=31.7$; $p<0.001$) and the number of meals taken outside the home ($X^2=48.8$; $p<0.001$). Also, 16.6% (n=45) of respondents with FS reported having decreased the number of meals away from home in the three months prior to the interview time.

distribuição Normal através do coeficiente de correlação de Pearson e utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman como o seu equivalente não paramétrico.

Utilizou-se o teste do qui-quadrado para analisar associações entre variáveis de natureza qualitativa e estudou-se a associação não ajustada entre os as variáveis em estudo e a situação de IA através do cálculo do odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%), estimado através de regressão logística univariada. Considerou-se uma significância de 0,05 como indicador de diferenças ou associações estatisticamente significativas em todos os testes que foram levados a cabo.

Resultados

A amostra final foi composta por 384 participantes, 24% (n=91) do sexo masculino e 76% (n=293) do sexo feminino, com idade entre 18 e 97 anos (M=56,4; DP=17,76). O nível de instrução formal mais comum do interlocutor foi a 1º ciclo do Ensino Básico (31,3%; n=120). Relativamente à composição dos agregados familiares, verificou-se que a maior parte dos agregados (38,2%; n=146) eram compostos apenas por duas pessoas. Mais de metade dos agregados (55,7%; n=214) não incluíam indivíduos com mais de 65 anos.

Utilizando o IMC como indicador do estado nutricional, determinou-se que 40,6% dos participantes possuía sobrecarga ponderal e que 16,8% dos participantes eram classificados como obesos.

A maioria dos participantes referiu comprar habitualmente alimentos para o agregado familiar (90,9%), confeccionar refeições (85,4%) e utilizar azeite para o fazer (97,7%).

Verificou-se que 29,4% dos participantes (n=113) apresentava algum grau de IA. Cerca de 2% dos participantes (2,1%; n=8) apresentava IA grave. Os resultados dos itens da escala de SA e a prevalência de IA estão apresentadas na Tabela 1.

A prevalência de algum grau de IA aparenta estar associada a uma diminuição do consumo de alimentos essenciais ($\chi^2=64,2$; $p<0,001$), da compra de medicamentos ($\chi^2=36,6$; $p<0,001$), do número de idas ao médico ($\chi^2=31,7$; $p<0,001$) e do número de refeições feitas fora de casa ($\chi^2=48,8$; $p<0,001$). Verificou-se também que 16,6% (n=45) dos inquiridos classificados como estando numa situação de SA referiram ter diminuído o número de refeições fora de casa nos últimos 3 meses.

Table 1 - Food insecurity - questions regarding the three months prior to the survey.
Tabela 1 - Insegurança alimentar - questões referentes aos 3 meses anteriores à inquirição.

	Prevalence (%) / Prevalência (%)	95% CI / 95% IC	n
Food insecurity (n=384) / Insegurança alimentar (n=384)			
No food insecurity / Sem insegurança alimentar	70.6	65.9 – 75.0	271
With some degree of food insecurity / Com algum grau de insegurança alimentar	29.4	25.0 – 34.1	113
Mild food insecurity / Insegurança alimentar ligeira	24.2	20.1 – 28.7	93
Moderate food insecurity / Insegurança alimentar moderada	3.1	1.7 – 5.2	12
Severe food insecurity / Insegurança alimentar grave	2.1	1.0 – 3.9	8
All households (n=384); “In the last 3 months...” / Todos os participantes (n=384)			
... I was worried that the food in my home would end before I could buy, receive, or produce more food / Sentiu-se preocupado(a) pelo facto de os alimentos em casa poderem acabar antes que tivesse dinheiro suficiente para comprar mais	25.8	21.6 – 30.3	99
... food ended before I had money to buy more / Os alimentos em casa acabaram antes de ter dinheiro para comprar mais	6	4.0 – 8.7	23
... I ran out of money, and I could not have a healthy and varied diet / Os membros do agregado familiar ficaram sem dinheiro suficiente para conseguirem ter uma alimentação saudável e variada	7.3	5.0 – 10.2	28
... I consumed only the foods already in house because there was not enough money to buy food / Os membros do agregado familiar tiveram de consumir apenas alguns alimentos que ainda tinham em casa por terem ficado sem dinheiro	14.1	10.9 – 17.8	54
... I skipped a meal because there was not enough money to buy food / Um adulto do agregado familiar deixou de fazer uma refeição porque não tinha dinheiro suficiente para comprar alimentos	3.1	1.7 – 5.2	12
... I ate less than I thought I should because there was not enough money to buy food / Um adulto do agregado familiar comeu menos do que achou que devia por não ter dinheiro suficiente para comprar alimentos	6.5	4.4 – 9.4	25
... I felt hungry but did not eat because I could not buy enough food / Um adulto do agregado familiar sentiu fome, mas não comeu por falta de dinheiro para comprar alimentos	2.3	1.2 – 4.2	9
... I spent one entire day without eating or had only one meal per day because there was no money to buy food / Um adulto do agregado familiar ficou um dia inteiro sem comer ou realizou apenas uma refeição ao longo do dia, por não ter dinheiro suficiente para comprar alimentos	1.6	0.7 – 3.2	6
Households with minors (n=103); “In the last 3 months...” / Participantes de agregados familiares com menores de idade (n=103)			
... children/adolescents in the household I could not have a healthy and varied diet did because there was not enough money to buy food / As crianças/adolescentes do agregado familiar não conseguiram ter uma alimentação saudável e variada por falta de dinheiro	1	0.1 – 4.4	1
... children/adolescents in the household consumed only the foods already in house because there was not enough money to buy food / As crianças/adolescentes do agregado familiar tiveram de consumir apenas alguns alimentos que ainda tinham em casa por terem ficado sem dinheiro	2.9	0.8 – 7.6	3
... children/adolescents ate less than they should because there was not enough money to buy food / No geral, uma criança/adolescente do agregado familiar comeu menos do que devia por não haver dinheiro para comprar alimentos	0	.	0
... children/adolescents in the household reduced the amount of food in meals because there was not enough money to buy food / Foi diminuída a quantidade de alimentos das refeições de uma criança/adolescente do agregado familiar por não haver dinheiro suficiente para comprar alimentos	1	0.1 – 4.4	1
... children/adolescents in the household skipped a meal because there was not enough money to buy food / Uma criança/adolescente do agregado familiar deixou de fazer uma refeição por não haver dinheiro suficiente para comprar alimentos	0	.	0
... children/adolescents in the household felt hungry but did not eat because there was not enough money to buy food / Uma criança/adolescente do agregado familiar sentiu fome, mas não comeu por falta de dinheiro para comprar alimentos	0	.	0

CI95% – confidence interval for population mean; n – sample size.

IC95% – intervalo de confiança a 95% para média populacional; n – tamanho da amostra.

Table 2 - Food insecurity and sociodemographic characteristics of the sample (n=384)
Tabela 2 - Insegurança alimentar e características sociodemográficas dos participantes (n=384)

	With some degree of FI (n=113) Com algum grau de IA (n=113)			Without FI (n=271) Sem IA (n=271)			P value* Valor de p*	Correlation with FI scale Correlação com escala de IA R _{Spearman}
	M / M	Md / Md	SD / DP	M / M	Md / Md	SD / DP		
Age (years) / Idade (anos)	55.6	59.0	18.4	56.7	57.0	17.5	0.551	-0.021
BMI (kg/m ²) / IMC (kg/m ²)	26.47	25.4	4.99	25.94	25.7	4.12	0.840	0.015
Number of MOH / Elementos no agregado familiar	2.64	2.0	1.54	2.47	2.0	1.19	0.681	0.019
MOH aged > 65 / Elementos com idade > 65	0.58	0	0.77	0.64	0	0.79	0.449	-0.033
Unemployed / Elementos desempregados	0.24	0	0.49	0.17	0	0.49	0.049	0.116 ^a
MOH contributing to income / Pessoas que contribuem para o rendimento familiar	1.75	2.0	0.82	1.74	2.0	0.64	0.423	-0.053
MOH who drink alcohol / Consumidores de álcool	1.43	1	0.60	1.54	1	0.70	0.251	-0.086
Number of MOH who smoke / Número de fumadores	1.49	1	0.66	1.28	1	0.52	0.041	0.193 ^a

FI – Food Insecurity; M – mean; Md – Median; SD – standard deviation; BMI – Body Mass Index; MOH – members of the household

* Mann-Whitney's test for group differences between group with some degree of FI and without FI

^a Statistically significant for p<0.05; ^b Statistically significant for p<0.01

IA – Insegurança Alimentar; M – média; Md – Mediana; DP – desvio padrão; n – tamanho da amostra

* teste de *Mann-Whitney* para diferenças entre grupo com algum grau de IA e grupo sem IA

^a Correlação estatisticamente significativa para p<0,05; ^b Correlação estatisticamente significativa para p<0,01

When analysing the differences in FI according to socio-demographic and anthropometric characteristics (Table 2), a statistically significant positive correlation was observed between the FI scale and the number of unemployed members of the household ($r_{\text{Spearman}}=0.116$; $p<0.05$) and between the FI scale and the number of smokers in the household ($r_{\text{Spearman}}=0.193$; $p<0.05$). Thus, unemployment in the household and the existence of smoking habits seem to be associated with higher FI.

The odds-ratio (OR) for FI was 2.22 (95% CI between 1.39 and 3.55) in smokers, when compared with that of non-smokers (Table 3).

The level of education, more specifically having a completed a higher education degree, seems to be a moderate protective factor for FI. Participants with higher education have an OR of 0.78 (95% CI between 0.66 and 0.92) for FI when compared to participants who have only completed primary education.

Quando analisadas as diferenças nas características sociodemográficas e antropométricas de acordo com o grau de IA (Tabela 2), observou-se uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a escala de IA e o número de desempregados no agregado familiar ($r_{\text{Spearman}}=0,116$; $p<0,05$) e entre a escala de IA e o número de fumadores no agregado familiar ($r_{\text{Spearman}}=0,193$; $p<0,05$). Assim, o desemprego no agregado familiar e a existência de hábitos tabágicos parecem estar associados a maior IA.

Quando estimado o OR para a prevalência de algum grau de IA de acordo com as características dos participantes, verifica-se que os fumadores apresentam 2,22 (IC95% entre 1,39 e 3,55) vezes maior risco de IA do que os não fumadores (Tabela 3).

O grau de instrução, mais concretamente, possuir instrução a nível do Ensino Superior, aparenta ser um fator protetor, ainda de forma moderada, para a IA. Os participantes que concluíram este grau de ensino apresentam um OR de 0,78 (IC95% entre 0,66 e 0,92) para IA quando comparados com os participantes que concluíram apenas o Ensino Básico.

Table 3 - Prevalence and odds ratio for food insecurity, according to sociodemographic characteristics.**Tabela 3** - Prevalência e odds ratio para insegurança alimentar e características dos participantes.

		FI Prevalence / Prevalência de IA		P *	OR (95%IC) / OR (IC95%)	
		%	n			
Nationality / Nacionalidade	Portuguese (n=367) / Portuguesa (n=367)	30.2	111	0.102	3.25 (0.73-14.46)	
	Foreign (n=17) / Estrangeira (n=17)	11.8	2			
Education level / Instrução	Cannot read nor write (n=11) / Não sabe ler nem escrever (n=11)	36.4	4	0.253	1.14 (0.32-4.13)	
	Can read, but without formal schooling (n=4) / Lê sem ter frequentado a escola (n=4)	25	1			
	Level 1 – 4 years of schooling (n=120) / Ensino Básico - 1.º ciclo (n=120)	33.3	40	Reference / Referência		
	Level 2 – 6 years of schooling (n=38) / Ensino Básico - 2.º ciclo (n=38)	31.6	12	1.08 (0.50-2.37)		
	Level 3 – 9 years of schooling (n=68) / Ensino Básico - 3.º ciclo (n=68)	33.8	23	0.98 (0.52-1.84)		
	Secondary School (n=88) / Ensino Secundário (n=88)	28.4	25	1.26 (0.69-2.29)		
	Higher Education (n=55) / Ensino Superior (n=55)	14.5	8	0.78 (0.66-0.92)		
Employment / Situação Profissional	Employed (n=197) / Ativo(a) (n=197)	27.4	54	0.789	Reference / Referência	
	Stay-at-home parent (n=11) / Doméstica(o) (n=11)	36.4	4			0.66 (0.186-2.35)
	Student (n=3) / Estudante (n=3)	33.3	1			0.76 (0.07-8.50)
	Retired (n=146) / Reformado(a) (n=146)	29.5	43			0.91 (0.56-1.45)
	Unemployed (n=24) / Desempregado(a) (n=24)	41.7	10			0.53 (0.22-1.26)
	Unknown (n=3) / Desconhecido (n=3)	33.3	1			0.76 (0.07-8.50)
Household with member who drinks alcohol / Agregado com consumidor de bebidas alcoólicas	Yes (n=235) / Sim (n=235) No (n=149) / Não (n=149)	23.8 38.3	56 57	0.003	0.51 (0.32-0.79)	
Household with member who drinks smokes / Agregado com fumador	Yes (n=110) / Sim (n=110) No (n=274) / Não (n=274)	41.8 24.5	46 67			0.001
Household with member who is a minor / Agregado com menor de idade	Yes (n=106) / Sim (n=106) No (n=277) / Não (n=277)	32.1 28.5	34 79	0.436	1.21 (0.75-1.97)	

FI – Food insecurity; OR – *odds ratio*; 95%CI – 95% confidence interval for population proportion; n - sample size

* Chi-square test for independence

IA – Insegurança Alimentar; OR – *odds ratio*; IC95% – intervalo de confiança a 95% para média populacional; n – tamanho da amostra

* Teste do qui-quadrado para independência

Table 4 - Prevalence and odds ratio for food insecurity, according to sociodemographic characteristics.

Tabela 4 - Prevalência e odds ratio para insegurança alimentar e características dos participantes.

	Prevalence (%) / Prevalência (%)	95% CI / 95% IC	n
All household representatives (n=384) / Todos os participantes (n=384)			
Uses olive oil as main culinary fat / Utiliza azeite como principal gordura para cozinhar	96.6	94.8 - 98.3	371
Intake of at least four tablespoons of olive oil in a given day / Consume diariamente pelo menos quatro colheres de sopa de azeite	38.3	33.8 - 43.5	147
Daily intake of at least two servings of vegetables / Consume diariamente pelo menos duas porções de produtos hortícolas	59.4	54.4 - 64.2	228
Daily intake of at least three servings of fruit / Consume diariamente pelo menos três peças de fruta	56.0	51.0 - 60.9	215
Daily intake of less than one serving of red meat / Consume diariamente menos do que uma porção de carne vermelha	73.7	69.1 - 77.9	283
Daily intake of less than one serving of butter, margarine, or cream / Consume diariamente menos do que uma porção de manteiga, margarina, ou natas	42.7	37.8 - 47.7	164
Daily intake of less than one sweet or carbonated beverage / Consume diariamente menos do que uma bebida açucarada e/ou gaseificada	75.5	71.0 - 79.6	290
Weekly intake of at least seven servings of 100 mL of wine / Bebe semanalmente pelo menos sete copos de 100 ml de vinho	15.6	12.3 - 19.5	60
Weekly intake of at least three servings of legumes / Consume semanalmente pelo menos três porções de leguminosas	22.9	19.0 - 27.4	88
Weekly intake of at least three servings of fish or shellfish / Consume semanalmente pelo menos três porções de peixe ou marisco	73.4	68.9 - 77.7	282
Intake of commercial sweets or pastries less than twice a week / Consume menos do que duas vezes por semana produtos de pastelaria ou doces comerciais	53.9	48.9 - 58.8	207
Weekly intake of at least three servings of nuts / Consume pelo menos três vezes por semana uma porção de frutos secos gordos	23.2	19.2 - 27.6	89
Preferentially consumes chicken, turkey, or rabbit meat instead of veal, pork, hamburger, or sausage / Consume preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco, hambúrguer ou salsichas	79.9	75.9 - 83.9	307
Intake of vegetables, pasta, rice, or other dishes seasoned with sofrito, at least twice a week / Consume, pelo menos duas vezes por semana, massa, arroz, hortícolas cozidos ou outros pratos confecionados com um estufado/refogado	79.4	75.2 - 83.2	305
Mediterranean Diet Pattern adherence (n=384) / Categorias de adesão ao padrão alimentar mediterrânico (n=384)			
Adheres to Mediterranean Diet Pattern / Com boa adesão ao padrão alimentar mediterrânico	24.7	20.6 - 29.2	95
Does not adhere to Mediterranean Diet Pattern / Adesão baixa ou moderada ao padrão alimentar mediterrânico	75.3	70.8 - 79.4	289

95%CI – 95% confidence interval for population proportion; n - sample size

IC95% – intervalo de confiança a 95% para média populacional; n – tamanho da amostra

Curiously, there was also a favorable OR for FS in individuals who consume alcoholic beverages compared to non-consumers (OR=0.51; 95%CI between 0.32 and 0.79).

Only 24.7% of the participants achieved a score of 10 or more points in the PREDIMED scale and, thus, have a good adherence to MDP (Table 4).

Curiosamente, registou-se também um OR favorável para SA nos indivíduos que consomem bebidas alcoólicas, quando comparados com os não consumidores (OR=0,51; IC95% entre 0,32 e 0,79).

Apenas 24,7% dos participantes apresenta uma boa adesão ao PAM, o que corresponde a uma pontuação igual ou superior a 10 na escala PREDIMED (Tabela 4).

Table 5 - Mediterranean diet pattern adherence and food insecurity in all participants (n=384).
Tabela 5 - Adesão ao padrão alimentar mediterrânico e insegurança alimentar em todos os participantes (n=384)

	Adheres to MDP / Boa adesão ao PAM		Does not adhere to MDP / Adesão baixa ao PAM		PREDIMED Score / Pontuação PREDIMED			
	%	n	%	n	M / M	Md / Md	SD / DP	IC95% / 95% IC
Without FI (n=271) / Sem IA (n=271)	28.4	77	71.6	194	8.2	8	2.08	7.9 – 8.4
With some degree of FI (n=113)* / Com algum grau de IA (n=113)*	15.9	18	84.1	95	7.3	7	2.16	6.9 – 7.7
Mild FI (n=79) / IA ligeira (n=79)	15.1	14	84.9	79	7.3	7	1.76	6.1 – 8.4
Moderate FI (n=9) / IA moderada (n=9)	25.0	3	75.0	9	6.8	6	1.91	5.2 – 8.4
Severe FI (n=7) / IA grave (n=7)	12.5	1	87.5	7	7.3	7	2.16	6.9 – 7.7

MDP – Mediterranean Diet Pattern; FI – Food insecurity; M – mean; Md – median; SD – standard deviation; 95%CI – 95% confidence interval for population proportion.

Statistically significant differences between groups with or without FI in adherence to MDP ($X^2=6,7$; $p=0,01$) and in PREDIMED score ($U=11474,5$; $p<0,001$)

PAM - padrão alimentar mediterrânico; M – média; Md – mediana; DP – desvio padrão; IC95% – intervalo de confiança a 95% para média populacional

* Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com IA e sem IA no teste do qui-quadrado para a proporção ($X^2=6,7$; $p=0,01$) e no teste de Mann-Whitney para os valores medianos da escala PREDIMED ($U=11474,5$; $p<0,001$)

Even though overall adherence to MDP is low, participants with some degree of FI have lower adherence ($p=0.01$) and lower median and mean values on the PREDIMED scale score ($U=11474.5$; $p<0.001$) (Table 5).

Ainda que, no geral, a adesão ao PAM seja baixa, os participantes com algum grau de IA possuem uma adesão mais baixa que os participantes sem IA ($\chi^2=6,7$; $p=0,01$) e valores medianos e médios mais baixos na pontuação na escala PREDIMED ($U=11474,5$; $p<0,001$) (Tabela 5).

Discussion

Research on FI has been conducted using different methodological approaches with regard to the sampling method, data collection tools, study populations, different socio-economic and political contexts, or FI evaluation tools.

Despite the existence of different estimates, FI prevalence is high in countries with developed economies, such as Australia and Japan (21.7% of households, and 15.7%, respectively, in 2012); Canada (7.7%, in 2007/8), and across the European Union (8.7% when 27 countries are included); and the US (15% of the population) (2).

In Portugal, the literature shows a trend for FI increase. The first FI study in Portugal, conducted in 2003, reported a national prevalence of 8.1% (19). Another nationwide study, the Fourth National Health Survey (2005-2006), reported a prevalence of 16.5% (20), and

Discussão

A investigação sobre IA tem sido levada a cabo com recurso a diferentes abordagens metodológicas no que diz respeito ao método de amostragem, às ferramentas de colheita de dados, às populações em estudo, aos diferentes contextos socioeconómicos e políticos, ou às ferramentas de avaliação de IA.

Apesar de existirem diferentes estimativas, a IA é elevada em países com economias desenvolvidas, como a Austrália e o Japão (21,7% e 15,7% dos agregados, respetivamente, em 2012), o Canadá (7,7% em 2007/2008), na União Europeia (8,7%, em 27 países), e nos Estados Unidos da América (15% da população) (2).

Em Portugal, a literatura apresenta números dispares para a prevalência mas evidencia uma tendência para

the INFOFAMÍLIA study (11), conducted during a period of great economic and social instability (2011 to 2014), reported a mean prevalence between 48.5% and 50.7%, with a prevalence in the Algarve of 59.5%, from which 15.1% corresponded to severe FI.

More recently, the National Food and Physical Activity Survey 2015-2016, showed a prevalence of 10.1% of FI in Portuguese households, of which 2.6% would correspond to moderate or severe FI. This national survey also showed significant differences between regions, with higher prevalence in the Autonomous Region of the Azores (13.4%) and the Autonomous Region of Madeira (13.2%), and lower prevalence in the Centre (8.5%) and Algarve (5.8%) regions (21). Data from the Portuguese Epidemiology of Chronic Diseases Cohort Study (EpiDoC) for the same period, collected using the Brazilian Scale of Food Insecurity, show a prevalence of FI in Portugal of 19.3% in a total of 5,653 participants, with food insecure households presenting low adherence to DM. Diabetes, rheumatic disease, depression symptoms, lower health-related quality of life, and a higher disability were independently associated with food insecurity (22).

Our data show a prevalence of 29.4% for FI in the households of the Algarve (24.2% for mild FI, 3.1% for moderate FI and 2.1% for severe FI). Due to methodological similarities with the INFOFAMÍLIA study (11), we consider it more appropriate to compare the current results with those of that national study, allowing us to infer that there may have been a decrease in prevalence, although there are results that prompt further research and intervention. In the INFOFAMÍLIA study, even after adjustment for socio-economic variables, the Algarve had a high prevalence of FI (59.5%, of which 15.1% corresponded to severe FI) and living in the Algarve was considered a risk factor for all levels of FI except for mild FI (11).

In this study, the economic, cultural, and social context of the Algarve households also proved to be important. Positive associations were found between the degree of FI and the number of unemployed in the household, the number of smokers and lower education level. These three risk factors for FI are identified in the literature and show a complex interrelationship in addition to their association with FI.

o seu aumento, desde o estudo “Uma observação sobre Insegurança Alimentar”, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em 2003, onde se registou uma prevalência nacional de IA de 8,1% (19), passando pelo Quarto Inquérito Nacional de Saúde (2005-2006), no qual se verificou uma prevalência de 16,5% de IA (20), até ao estudo INFOFAMÍLIA (11), realizado num período de grande instabilidade económica e social (2011 a 2014), onde se registou uma prevalência média entre 48,5% e 50,7%, com prevalência no Algarve de 59,5%, da qual 15,1% correspondia a IA grave.

Mais recentemente, o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física 2015-2016, revelou uma prevalência de 10,1% de IA nas famílias portuguesas, dos quais 2,6% corresponderiam a IA moderada ou grave. Este inquérito nacional mostrou também diferenças significativas entre regiões, com prevalências mais elevadas na Região Autónoma dos Açores (13,4%) e na Região Autónoma da Madeira (13,2%), e prevalências mais baixas nas regiões Centro (8,5%) e no Algarve (5,8%) (21). Dados da coorte portuguesa do estudo EpiDoc - Epidemiology of chronic non-communicable diseases and aging para 2016 e 2017, recolhidos com recurso à Escala Brasileira de Insegurança Alimentar, mostram uma prevalência de IA em Portugal de 19,3%, num total de 5653 participantes, com os agregados familiares com IA a apresentar baixa adesão à DM. Neste estudo, a diabetes, indícios de depressão, pior qualidade de vida e maior prevalência de incapacidade foram fatores associados de forma independente com a IA (22).

O presente trabalho indica uma prevalência de 29,4% para IA nos agregados familiares da população do Algarve (24,2% para a IA Ligeira, 3,1% para a IA Moderada e 2,1% para a IA Grave). Devido às semelhanças metodológicas com o estudo INFOFAMÍLIA (11), julga-se mais pertinente a comparação dos atuais resultados com os desse estudo nacional, o que permite propor que poderá ter-se verificado uma diminuição na prevalência, mas continuam a registar-se indicadores que carecem de investigação adicional e de intervenção. No estudo INFOFAMÍLIA, mesmo após ajuste para variáveis socioeconómicas, o Algarve apresentava prevalência elevada de IA (59,5%, da qual 15,1% correspondia a IA grave) e residir no Algarve foi considerado um fator de risco para todos os níveis de IA à exceção da IA Ligeira (11).

Neste trabalho, o contexto económico, cultural e social dos agregados do Algarve também se revelou importante. Encontrou-se associações positivas entre o

Unemployment is associated, as indicated in the literature (11,23–26), with a higher risk of FI as a result of low economic availability to buy food. In this study, the prevalence of unemployed participants (6.3%) is slightly below the unemployment rate registered by the National Institute of Statistics (32) for the Algarve region (7.7%). We also found that in 34.9% of the households the income is the result of only one element, in line with the results of the INFOFAMÍLIA study (11), where the contribution of only one element to the household income was 35.8%.

The decrease in purchasing power is identified in the literature as one of the causal factors of the association between smoking habits and AI, due to smokers diverting economic resources from food to the purchase of tobacco (27), or, antagonistically, to the increased anxiety caused by the FI situation, which will result in increased smoking behaviors (28–31).

Similarly, to what is described in the literature (23,27), this work identified the level of education, also related to income, as a risk factor for FI. The proportion of participants in this study who completed only the first level of basic education (31.3%; 95% CI between 26.8% and 36%) is higher than the national average (22.4%), indicated by the National Institute of Statistics for the same period (32), which may result in a confounding effect, which should be clarified in future studies.

The same confounding bias may explain the favourable OR for FS in individuals who consume alcoholic beverages compared to non-consumers (OR=0.51; 95% CI between 0.32 and 0.79). These results are contrary to what is expected and indicated by the literature, but it is thought that they may be caused by the low consumption of alcoholic beverages among participants presenting risk factors for FI (11,23,33).

Adherence to the MDP is, in general, low, and this low adherence is associated with FI. It is necessary to clarify whether this association is due to the association between low adherence to MDP and a lower socioeconomic status, documented in the literature (34), or to an as yet unclear role of MDP in FI.

grau de IA e o número de desempregados no agregado familiar, o número de fumadores e a baixa escolaridade. Estes três fatores de risco para IA estão identificados na literatura e apresentam uma inter-relação complexa, para além da sua associação com a IA.

O desemprego está associado, como indicado na literatura (11,23–26), a um risco mais elevado de IA, fruto da baixa disponibilidade económica para comprar alimentos. Neste estudo, a prevalência de participantes desempregados encontrada neste estudo (6,3%) situa-se ligeiramente abaixo da taxa de desemprego registada pelo Instituto Nacional de Estatística (32) para a região do Algarve (7,7%) e verificou-se que em 34,9% dos agregados o rendimento era fruto apenas de um elemento, em linha com os resultados do estudo INFOFAMÍLIA (11), onde o contributo de apenas um elemento para o rendimento do agregado era de 35,8%.

A diminuição do poder de compra é identificada na literatura como um dos fatores causais da associação entre hábitos tabágicos e IA, devido aos fumadores desviarem recursos económicos dos alimentos para a compra de tabaco (27), ou, de forma antagónica, ao aumento da ansiedade provocada pela situação de IA, que resultará em comportamentos tabágicos aumentados (28–31).

À semelhança do descrito na literatura (23,27), este trabalho identificou o grau de instrução, também com relação com o rendimento, como um fator de risco para IA. A proporção de participantes neste estudo que concluiu apenas o 1.º ciclo do Ensino Básico (31,3%; IC95% entre 26,8% e 36%) é mais elevada do que média nacional (22,4%) indicada pelo Instituto Nacional de Estatística para o mesmo período (32) que pode resultar num efeito de confundimento, que deve ser esclarecido em estudos futuros.

O mesmo viés de confusão poderá explicar o OR favorável para SA nos indivíduos que consomem bebidas alcoólicas, quando comparados com os não consumidores (OR=0,51; IC95% entre 0,32 e 0,79). Estes resultados são contrários ao esperado e ao indicado pela literatura, mas julga-se que possam ser causados pelo baixo consumo de bebidas alcoólicas entre participantes que apresentam fatores de risco para a IA (11,23,33).

No que diz respeito ao PAM, verifica-se que, no geral, a adesão a este padrão alimentar é baixa. Documentou-se também uma associação entre IA e baixa adesão ao PAM. É necessário esclarecer se esta associação se deve à associação, documentada na literatura, entre a baixa adesão ao PAM e um nível socioeconómico mais baixo (34) ou a um papel ainda por esclarecer do PAM na IA.

This study has several limitations that must be identified and addressed. We conducted a cross-sectional study, which limits the establishment of causal and temporal inferences about the association between the variables. In addition, although a random sample of households was constructed in each municipality of the Algarve, data on education for the sample were dissimilar from those reported by the National Institute of Statistics. We are unable to analyze our data further, in order to discuss if there is a confounder. Additionally, weight and height were self-reported, which can suggest a bias in data collection.

These limitations indicate that the interpretation and generalization of our results should be made with caution. Nevertheless, given that this work is the first to analyze FI in detail only in the Algarve region, this paper can add value for the planning of specific interventions adapted to this population.

Conclusion

This was the first study on FI conducted only within the Algarve region, and we found a 29.4% prevalence. Households with more unemployed elements, smokers, and where adherence to the MDP is lower have a higher prevalence of FI. Additionally, it can be concluded that most of the population follows eating patterns different from the one promoted by the Mediterranean Diet.

The quantification and characterization of FI, as well as its determinants, is crucial for the development of policies to promote FS and healthy eating habits. Thus, we conclude that the results of this study can contribute to the planning of interventions in the Algarve region, which presents sociodemographic and economic characteristics that constitute an important challenge in the adequacy of health education strategies. Our results will allow that intervention projects that are planned or that are already underway can be tailored to the specific populational characteristics and improve their effectiveness.

O presente estudo tem subjacentes limitações que importa evidenciar. Realizou-se um trabalho com um desenho de estudo de natureza transversal, o que limita o estabelecimento de inferências causais e temporais acerca da associação entre as variáveis estudadas. Adicionalmente, ainda que se tenha construído uma amostra aleatória de agregados familiares em cada freguesia do Algarve, estratificada por densidade populacional, verificou-se uma discrepância na distribuição da escolaridade em relação à informação disponível sobre a região. Adicionalmente, considerando que o peso e a altura foram autorreportadas, os resultados associados a estas variáveis podem estar sujeitos a viés.

Estas limitações indicam que a interpretação e generalização dos resultados deve ser feita com cautela, mas considera-se que, dado que este trabalho é o primeiro a analisar com detalhe a IA apenas na região do Algarve, este documento é uma mais-valia para o planeamento de intervenções específicas, adaptadas a esta população.

Conclusões

Este foi o primeiro estudo sobre a IA realizado apenas na região do Algarve e verificou-se uma prevalência de IA de 29,4%. A IA parece ser mais prevalente em agregados familiares com maior número de desempregados, de fumadores e onde a adesão ao PAM é mais baixa, ainda que se possa concluir que a maior parte da população tem um padrão alimentar diferente daquele promovido pela Dieta Mediterrânica.

A quantificação e caracterização da IA, bem como dos seus determinantes, é crucial para a elaboração de políticas de promoção da SA e de hábitos alimentares saudáveis. Assim, conclui-se que os resultados deste trabalho podem contribuir para o planeamento de intervenções na região do Algarve, que apresenta características sociodemográficas e económicas que constituem um desafio importante na adequação das estratégias de educação para a saúde. Os resultados deste trabalho irão servir de base a projetos de intervenção social em planeamento ou já em curso, dirigidos à população Algarvia identificada como tendo maior risco de IA. As características populacionais com associação identificada com a IA permitirão dirigir as intervenções de forma a melhorar a sua efetividade.

Authors Contributions Statement

EP, AG and MPM, were responsible for study design, implementation, and data analysis. All authors share equal responsibility in drafting, editing, reviewing and final writing.

Funding

This study was supported by funding from the General Directorate of Health.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to the General Directorate of Health, represented during this research by Prof. Dr. Pedro Graça and Prof. Dr. Maria João Gregório; to the regional partnership for their support; to the *Prato Certo* team (Ana Poeta, Arlete Rodrigues, Catarina Vasconcelos) for their dedication; and to the team of nutritionists who carried out the fieldwork.

Conflict of Interests

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

Declaração sobre as contribuições do autor

EP, MPM e AG foram responsáveis pelo desenho e implementação do estudo e pela análise de dados. Todos os autores partilham igual responsabilidade na edição, revisão e redação do artigo.

Financiamento

Este projeto foi financiado pela DGS.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos à Direção Geral de Saúde, nas pessoas do Prof. Doutor Pedro Graça e da Prof. Doutora Maria João Gregório; à parceria regional, pelo apoio; à equipa do Prato Certo (Ana Poeta, Arlete Rodrigues, Catarina Vasconcelos) pela dedicação; e à equipa de nutricionistas que realizou o trabalho de campo.

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. Napoli, M. (2011). Towards a Food Insecurity Multidimensional Index (FIMI). Dissertação de Mestrado, Universidade de Roma.
2. Pollard, C. M., & Booth, S. (2019). Food Insecurity and Hunger in Rich Countries—It Is Time for Action against Inequality. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(10), 1804. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16101804>
3. Brown, A. G. M., Esposito, L. E., Fisher, R. A., Nicasastro, H. L., Tabor, D. C., & Walker, J. R. (2019). Food insecurity and obesity: research gaps, opportunities, and challenges. *Translational Behavioral Medicine*, *9*(5), 980–987. <https://doi.org/10.1093/TBM/IBZ1171>
4. Keenan, G. S., Christiansen, P., & Hardman, C. A. (2021). Household Food Insecurity, Diet Quality, and Obesity: An Explanatory Model. *Obesity*, *29*(1), 143–149. <https://doi.org/10.1002/OBY.23033>
5. FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2018). The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building climate resilience for food security and nutrition. (FAO).
6. Ayala, A., & Meier, B. M. (2017). A human rights approach to the health implications of food and nutrition insecurity. *Public Health Reviews*, *38*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S40985-017-0056-5/METRICS>
7. Fernandez, M. L., Raheem, D., Ramos, F., Carrascosa, C., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Highlights of Current Dietary Guidelines in Five Continents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *18*(6), 2814. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18062814>
8. Willett, W. (2021). Mediterranean Dietary Pyramid. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(9), 4568. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18094568>
9. Serra-Majem, L., Tomaino, L., Dermeni, S., Berry, E. M., Lairon, D., de la Cruz, J. N., Bach-Faig, A., Donini, L. M., Medina, F. X., Belahsen, R., Piscopo, S., Capone, R., Aranceta-Bartrina, J., La Vecchia, C., & Trichopoulou, A. (2020). Updating the Mediterranean Diet Pyramid towards Sustainability: Focus on Environmental Concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17238758>
10. Adherence to the Mediterranean diet among adults in Mediterranean countries: a systematic literature review. *European journal of nutrition*, 1–18. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02885-0>
11. Gregório, M. J., Graça, P., Santos, A. C., Gomes, S., Portugal, A. C., & Nogueira, P. J. (2017). Relatório Infofamília 2011–2014 Quatro anos de monitorização da Segurança Alimentar e outras questões de saúde relacionadas com condições socioeconómicas, em agregados familiares portugueses utentes dos cuidados de saúde primários do Serviço Nacional de Saúde. (Direção-Geral da Saúde, Ed.).
12. Cohen, J. (1988). Statistical Power Analysis for the Behavioural Science (2nd Edition). In *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (Vol. 3, Issue 2).
13. Gregório, M. J., Nogueira, P. J., Gomes, S., Santos, C. A., & Boavida, J. (2014). Proposta Metodológica para a Avaliação da Insegurança Alimentar em Portugal. *Nutricias*, *21*, 4–11
14. Pérez-Escamilla, R., Segall-Corrêa, A. M., Maranhã, L. K., Sampaio, M. D. F. A., Marín-León, L., & Panigassi, G. (2004). An adapted version of the U.S. Department of Agriculture Food Insecurity module is a valid tool for assessing household food insecurity in Campinas, Brazil. *The Journal of Nutrition*, *134*(8), 1923–1928. <https://doi.org/10.1093/JN/134.8.1923>
15. Bickel, G., Nord, M., Price, C., Hamilton, W., & Cook, J. (2000). Measuring Food Security in the United States Guide to Measuring Household Food Security Revised 2000. <http://www.fns.usda.gov/oane>.
16. Schröder, H., Fitó, M., Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Lamuela-Raventós, R., Ros, E., Salaverria, I., Fiol, M., Lapetra, J., Vinyoles, E., Gómez-Gracia, E., Lahoz, C., Serra-Majem, L., Pintó, X., Ruiz-Gutierrez, V., & Covas, M.-I. (2011). A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *The Journal of Nutrition*, *141*(6), 1140–1145. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135566>
17. World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation (WHO, Ed.).
18. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*, *310*(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.281053>
19. Branco, M., Nunes, B., & Cantreiras, T. (2003). Uma Observação sobre “Insegurança Alimentar.” Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
20. Instituto Nacional de Estatística, & Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2009). Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006 (Instituto Nacional de Estatística & Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Eds.).
21. Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Alarcão, V., Guiomar, S., Mota, J., Teixeira, P., Rodrigues, S., Lobato, L., Magalhães, V., Correia, D., Pizarro, A., Marques, A., Vilela, S., Oliveira, L., Paul, & Ramos, E. (2017). Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física IAN-AF, 2015–2016. In *U. Porto* (Vol. 112, Issue 483). <https://doi.org/10.1192/bjp.112.483.211-a>
22. Gregório, M. J., Rodrigues, A. M., Graça, P., de Sousa, R. D., Dias, S. S., Branco, J. C., & Canhão, H. (2018). Food Insecurity Is Associated with Low Adherence to the Mediterranean Diet and Adverse Health Conditions in Portuguese Adults. *Frontiers in Public Health*, *6*, 38. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00038>
23. Alvares, L., & Amaral, T. F. (2014). Food insecurity and associated factors in the Portuguese population. *The Nevin Scrimshaw International Nutrition Foundation*, *35*(4), 395–402. <https://doi.org/10.1177/156482651403500401>
24. Oliveira, L., & De, Andro J. G. (2015). Avaliação da Insegurança Alimentar, Qualidade de Vida e Autoeficácia Alimentar na Ilha Terceira Avaliação da Insegurança Alimentar, Qualidade de Vida e Autoeficácia Alimentar na Ilha Terceira, Açores. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto.
25. Gowda, C., Hadley, C., & Aiello, A. E. (2012). The association between food insecurity and inflammation in the US adult population. *American Journal of Public Health*, *102*(8), 1579–1586. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2011.300551>
26. Rose, D. (1999). Economic Determinants and Dietary Consequences of Food Insecurity in the United States. *The Journal of Nutrition*, *129* (2), 517S–520S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.2.517S>
27. Martin-Fernandez, J., Grillo, F., Parizot, I., Caillavet, F., & Chauvin, P. (2013). Prevalence and socioeconomic and geographical inequalities of household food insecurity in the Paris region, France. *BMC Public Health*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-486>
28. Inglesias-Rios, L., Bromberg, J. E., Moser, R. P., & Augustson, E. M. (2015). Food Insecurity, Cigarette Smoking, and Acculturation Among Latinos: Data from NHANES 1999–2008. *Journal of Immigrant and Minority Health*, *17*(2), 349–357. <https://doi.org/10.1007/s10903-013-9957-7>
29. Cutler-Triggs, C., Fryer, G. E., Miyoshi, T. J., & Weitzman, M. (2008). Increased rates and severity of child and adult food insecurity in households with adult smokers. *JAMA Pediatrics*, *162*(11), 1056–1062. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2008.2>
30. Armou, B. S., Pitts, M. M., & Lee, C.-W. (2008). Cigarette smoking and food insecurity among low-income families in the United States, 2001. *American Journal of Health Promotion*, *22*(6), 386–392. <https://doi.org/10.4278/ajhp.22.6.386>
31. John, R. M., Ross, H., & Blecher, E. (2011). Tobacco expenditures and its implications for household resource allocation in Cambodia. *Tobacco Control*, *21*(3), 341–346. <https://doi.org/10.1136/tc.2010.042598>
32. Instituto Nacional de Estatística. (2018). Estatísticas do Emprego – 4.o trimestre de 2017 (Issue 4, pp. 1–16).
33. Bergmans, R. S., Coughlin, L., Wilson, T., & Malecki, K. (2019). Cross-sectional associations of food insecurity with smoking cigarettes and heavy alcohol use in a population-based sample of adults. *Drug and Alcohol Dependence*, *205*, 107646. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.107646>
34. Bonaccio, M., Donati, M. I., Iacoviello, L., & Caetano, G. (2016). Socioeconomic determinants of the adherence to the Mediterranean diet at a time of economic crisis: the experience of the MOLI-SANI study. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, *8*, 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.059>

Short duration – low intensity isometric plantar flexion increases distal perfusion: observations from a healthy cohort

A flexão plantar isométrica de baixa intensidade e curta duração aumenta a perfusão distal: observações de uma coorte saudável

Margarida Florindo^{1,2,3}, João Gregório¹ & Luis Monteiro Rodrigues^{1,*}

¹Universidade Lusófona CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av Campo Grande, Lisboa, Portugal (EU); ²U Alcalá PhD Program Health Sciences-Alcalá (Madrid) Spain ; ³ESSCVP - the Portuguese Red Cross Health School. Dep. Physiotherapy | Lisboa, Portugal (EU)

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

Abstract

Controlled physical activity might help as a preventive and therapeutic tool in vascular pathology. In this study we aimed to understand how lower limb exercise impacts perfusion in a healthy cohort. The study involved a convenience sample of eighteen previously selected healthy individuals of both sexes (n=9 each), mean age 32.8 ± 12.7 years. Procedures respected all principles of good clinical practice. Blood perfusion changes were simultaneously assessed in the dorsal region of both feet by laser Doppler flowmetry (LDF) and polarised spectroscopy (PSp). Measurements were taken at baseline, after stabilization (phase I), following 1 minute of bipedal isometric plantar flexion (phase II), and during recovery (phase III). Descriptive and comparative statistics were performed. Plantar flexion evoked significant perfusion changes in both feet, but in opposite directions – increasing with LDF and decreasing with PSp. These changes indicate that this approach promotes an adaptive mobilisation of blood from superficial to the deeper plexus. No significant changes in arterial blood pressure or cardiac frequency were detected. This manoeuvre, needing no specialised supervision, is capable of promoting significant perfusion changes in the lower limb, showing potential to be further explored in future studies with a prospective design in a preventive/recovery context.

Keywords: plantar flexion; foot perfusion; laser Doppler flowmetry; polarised spectroscopy; PAHR - prompt adaptive hemodynamical response; physical activity; home-health

Resumo

A atividade física controlada pode ser uma ferramenta preventiva e terapêutica na patologia vascular. Neste estudo, o objetivo foi entender como o exercício nos membros inferiores afeta a perfusão num grupo de indivíduos saudáveis. O estudo envolveu uma amostra de conveniência de dezoito indivíduos saudáveis, de ambos os sexos ($32,8 \pm 12,7$ anos) previamente selecionados. Os procedimentos respeitaram todos os princípios da boa prática clínica. A perfusão sanguínea foi avaliada na região dorsal de ambos os pés por fluxometria de laser Doppler (LDF) e espectroscopia polarizada (PSp), após a estabilização basal (fase I), 1 minuto depois da flexão plantar isométrica bípede (fase II) e durante a recuperação (fase III). Foi efectuada análise estatística descritiva e comparativa. Foram detectadas alterações significativas em ambos os pés, em direções opostas – aumentando com LDF e diminuindo com PSp. Essas mudanças indicam que esta abordagem promove uma mobilização adaptativa do sangue do plexo superficial para o mais profundo. Não foram detectadas alterações significativas na pressão arterial ou na frequência cardíaca. Não necessitando de supervisão permanente, este exercício é capaz de promover alterações perfusionais significativas no membro inferior, mostrando potencial para ser explorado em estudos futuros com desenho prospectivo em contexto preventivo e de recuperação.

Palavras-chave: flexão plantar; perfusão do pé; fluxometria de laser Doppler; espectroscopia polarizada; RRAH - resposta rápida de adaptação hemodinâmica; atividade física; saúde em casa

Introduction

Physical activity and controlled exercise are commonly regarded as indispensable components of well-being, as well as useful in the prevention (or slowing the progression) of disease and favoring recovery from both injury and disease (1,2), and both are seen as principal to provide the necessary cardio-respiratory and microcirculatory operations that ensure normal tissue "performance" (2-5). A precise balance involving structural integrity to respond to neuroendocrine output affecting cardiorespiratory performance, systemic vascular resistance, and local microcirculatory (endothelial and myogenic) activity is permanently required (3). When unmet, the link between vascular damage and mobility loss is clear, as impairment regularly emerges with disease progression (6-9).

Routine daily exercise has been within the first line of therapeutic options in managing these patients. However, data on the impact of its implementation within an integrated healthcare strategy are still insufficient. Recent trials seem to confirm the beneficial potential of regular physical exercise, including walking, in the prevention of and recovery from cardiovascular conditions (10-12), yet some controversy persists. Regular physical activity seems to improve or even retard severe frailty in adults, although aerobic and resistance exercise may not be recommended (5,13). Exercise has also been recommended to improve lower limb hemodynamics in diabetic patients (9,14-16), even when neuropathy is already present (15). Results are not as clear in the presence of peripheral vascular disease (PVD), as the benefits of exercise seem to depend on the severity of the existing lesions and the presence of intermittent claudication (17,18). The patient's compliance, motivation, and communication within the "rehabilitation cluster" (patient, therapist, family, other professionals) to support positive progress toward both clinical and meaningful goals are also important determinants (19). According to various studies, the main reason for failing prescribed (therapeutic) physical activity is the "lack of time" (20-22). Some pathological processes are known to create and perpetuate a cycle that discourages the patient from performing activities requiring mobility (4,6,8,18,23). Thus, the patient's engagement is crucial, especially if accepting that even "small" exercises can be useful in vascular rehabilitation (19,23,24). Specific guidance involving a complex combination of aerobic exercise, strength education, flexibility coaching, and nutrition has been proposed to address many of these concerns (4,12,14,19,24,25).

Introdução

A atividade física e o exercício controlado são comumente considerados componentes indispensáveis do bem-estar, úteis na prevenção (ou retardamento da progressão) de várias doenças, e capazes de favorecer a recuperação (1,2). O movimento e o exercício controlados são vistos como principais para as funções cardio-respiratórias e microcirculatórias necessárias ao normal desempenho do tecido (2-5). Para responder ao débito neuroendócrino que afeta o desempenho cardiorrespiratório é necessário um equilíbrio permanente e preciso que envolve a integridade estrutural, a resistência vascular sistêmica e a atividade microcirculatória local (endotelial e miogênica) (3). Quando este equilíbrio não existe, ocorre dano vascular e perda de mobilidade normalmente associados à progressão da doença (6-9). O exercício diário está dentro da primeira linha de opções terapêuticas para a intervenção nestes pacientes. No entanto, os dados sobre o impacto da sua implementação dentro de uma estratégia integrada de saúde ainda são insuficientes. Ensaio recentes parecem confirmar o potencial benéfico do exercício físico regular, incluindo a caminhada, na prevenção e recuperação de doentes cardiovasculares (10-12). Contudo, persiste ainda alguma controvérsia. A atividade física regular parece melhorar ou mesmo retardar a fragilidade grave em adultos, embora o exercício aeróbico e de resistência pareçam não ser recomendados (5,13). O exercício também tem sido recomendado para melhorar a hemodinâmica dos membros inferiores em pacientes diabéticos (9,14-16), mesmo quando a neuropatia já está presente (15). Os resultados não são tão claros na presença de doença vascular periférica (DVP), pois os benefícios do exercício parecem depender da gravidade das lesões existentes e da presença de claudicação intermitente (17,18).

A adesão, motivação e comunicação do paciente quando integrado num grupo de reabilitação (paciente, terapeuta, família, outros profissionais) também são determinantes importantes para apoiar o progresso positivo em direção aos objetivos clínicos (19). De acordo com vários estudos, a principal razão para o falhanço na atividade física prescrita é a "falta de tempo" (20-22). Alguns processos patológicos são conhecidos por criar e perpetuar um ciclo que desencoraja o paciente a realizar atividades que exijam mobilidade (4,6,8,18,23). Por isso, o envolvimento do paciente é crucial, principalmente se aceitarmos que mesmo pequenos exercícios podem ser úteis na reabilitação vascular (19,23,24). Orientações

The impact of common low-intensity movement in the lower limb circulation has been a theme of study for our research group as we have sought relationships between movement and blood perfusion to identify and characterise the adaptive mechanisms involved (26-30). Recently we identified a centrally mediated response – the Prompt Adaptive Hemodynamic Response - in place of what we had believed to result from local interactions as in reactive hyperemia or in the venoarteriolar reflex (31). Moreover, we noted that simple challenges applied to a single limb, such as the reactive hyperemia associated with massage or a unipodal squat, would consistently impact blood perfusion in the other (contralateral) limb through this PAHR (28-31). Thus, we extended our research to investigate the impact of low-intensity short duration localised activity such as plantar flexion on foot microcirculation in the absence of disease. The objective of this exploratory study is to identify the distal perfusion variations related to the foot isometric plantar flexion in the upright position as close as possible to the normal physiological state.

Material and Methods

Participants

A convenience sample of sixteen healthy volunteers of both sexes (n=8 per sex) with a mean age of 31.9 ± 12.9 years old was chosen from our university community. Selected participants were required to be normotensive, non-smokers, and free of any medication or food supplementation. Blood pressure, cardiac frequency, the Ankle-Brachial Index a recognised indicator of vascular health (32) and the Body Mass Index calculated by the Quetelet's formula ($BMI = \text{weight}/\text{height}^2$, expressed in kg/m^2) (33,34) were also calculated. All participants reported some degree of physical activity, and some reported regular exercise, although none were athletes. All young women reported regular menstrual cycles. The general characteristics of the participant panel is summarized in Table 1.

específicas envolvendo uma combinação complexa de exercícios aeróbicos, educação de força, treinamento de flexibilidade e nutrição foram propostas para abordar muitas dessas preocupações (4,12,14,19,24,25).

O impacto do movimento comum de baixa intensidade na circulação dos membros inferiores tem sido um tema de trabalho para o nosso grupo de investigação, estudando relações entre movimento e perfusão sanguínea para identificar e caracterizar os mecanismos adaptativos envolvidos (26-30). Recentemente identificamos uma resposta centralmente mediada – a Resposta Rápida de Adaptação Hemodinâmica (PAHR). Em vez do que acreditávamos resultar de interações locais como ocorre na hiperemia reativa ou no reflexo venoarteriolar (31) verificámos que desafios simples aplicados a um único membro, como a hiperemia reativa associada à massagem ou o agachamento unipodal, modificam consistentemente a perfusão sanguínea no outro membro (contralateral) por meio desse PAHR (28-31). Assim, estendemos a nossa pesquisa para investigar o impacto da atividade localizada de baixa intensidade e de curta duração, como a flexão plantar, na microcirculação do pé na ausência de doença. O objetivo deste estudo exploratório foi identificar as variações de perfusão distal relacionadas com a flexão plantar isométrica do pé na posição ereta o mais próximo possível do estado fisiológico normal.

Material e Métodos

Participantes

Uma amostra de conveniência de dezasseis voluntários saudáveis de ambos os sexos (n=8 por sexo) com idade média de $31,9 \pm 12,9$ anos foi escolhida dentro de nossa comunidade universitária. Os participantes selecionados deveriam ser normotensos, não fumadores e livres de qualquer medicação ou suplementação alimentar. Pressão arterial, frequência cardíaca, Índice Tornozelo-Braço um reconhecido indicador de saúde vascular (32) e Índice de Massa Corporal calculado pela fórmula de Quetelet ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$, expresso em kg/m^2) (33,34) também foram calculados. Todos os participantes relataram algum grau de atividade física, e alguns exercício regular, embora nenhum fosse atleta. Todas as mulheres jovens relataram ciclos menstruais regulares. As características gerais do painel de participantes estão resumidas na Tabela 1.

Table 1 - Participants characterisation. Results are presented as medians and Q1-Q3 (25th empirical quartile - 75th quartile). Differences between groups assessed with the t-test or Mann-Whitney* test for independent samples. BMI, Body Mass Index; SYSTP, Systolic pressure; DIASP, Diastolic Pressure; ABI, ankle-brachial index; PR, Pulse Rate; bpm, beats per minute.

Tabela 1 - Caracterização dos participantes. Os resultados estão apresentados como medianas e Q1-Q3 (25º quartil empírico - 75º quartil empírico). Diferenças entre os grupos avaliados com o teste t ou Mann-Whitney* para amostras independentes. IMC, Índice de Massa Corporal; Sistólica, pressão sistólica; Diastólica, Pressão Diastólica; ITB, índice tornozelo-braço; FP, Frequência de Pulso; bpm, batimentos por minuto.

	Men / Homens	Women / Mulheres	p
N (%)	8 (50)	8 (50)	–
Smokers / fumadores (%)	no (100)	no (100)	–
Exercise, h/week / Exercício, h/semana (Q1-Q3)	4 (3-7.5)	3 (0-4)	–
Age, years / Idade, anos (Q1-Q3)	27.0 (23-44)	25.0 (23.0-34.0)	1.000*
Weight, kg / Peso, kg (Q1-Q3)	76.5 (65.6-84.6)	71.0 (65.0-84.6)	0.796*
Height, m / Altura, m (Q1-Q3)	1.8 (1.7-1.7)	1.6 (1.6-1.7)	0.000*
BMI, kg/m ² / IMC, kg/m ² (Q1-Q3)	24.5 (21.5-25.8)	24.9 (23.5-30.6)	0.382
SYSTP, mmHg / Sistólica, mmHg (Q1-Q3)	122.0 (102.5-127.0)	124.0 (114.8-126.3)	0.334
DIASP, mmHg / Diastólica, mmHg (Q1-Q3)	73.0 (69.0-75.5)	82.0 (75.8-87.8)	0.067
ABI / ITB (Q1-Q3)	1.1 (1.1-1.2)	1.2 (1.1-1.3)	0.444
PR, bpm / FP, bpm (Q1-Q3)	71.5 (67.5-79.8)	84.5 (74.5-92.3)	0.086

The absence of recent pathology of the foot that could influence the ankle joint during plantar flexion was an exclusion criterion and confirmed upon selection. Other restrictions included refraining from caffeine and alcohol consumption 24 hours prior to measurements, as well as any topical (including cosmetic) application in the assessment areas.

Footedness, regarded as a measure of the preference (dominance) and performance of one limb, was determined by the validated Portuguese version of the Lateral Preference Inventory (LPI) (35) and compared with the laser Doppler flowmetry perfusion values, which were used as a biomarker.

All participants were previously informed of the objectives and phases of the study and provided their informed written consent. Procedures fully respected the principles of good clinical practice defined for human research (36) and were evaluated by the institutional Ethics Committee (EC.ECTS/P03.20 de 2020) prior to study initiation.

A ausência de patologia recente do pé que pudesse influenciar a articulação do tornozelo durante a flexão plantar foi critério de exclusão confirmado durante a seleção. Outras restrições incluíam a abstenção do consumo de cafeína e álcool 24 horas antes das medições, bem como qualquer aplicação tópica (incluindo cosmética) nas áreas de avaliação.

A “Footedness” considerada como uma medida de preferência (dominância) e desempenho de um membro, foi determinado pela versão portuguesa validada do Lateral Preference Inventory (LPI) (35) e comparada com os valores de perfusão de fluxometria de laser Doppler, usados como biomarcador.

Todos os participantes foram previamente informados sobre os objetivos e fases do estudo e deram o seu consentimento informado por escrito. Os procedimentos respeitaram integralmente os princípios de boa prática clínica definidos para pesquisa em humanos (36) e foram avaliados pelo Comitê de Ética institucional (EC.ECTS/P03.20 de 2020) antes do início do estudo.

Experimental

Measurements were conducted in the research lab with controlled temperature (21 ± 2 °C), light and humidity (40 - 60%) conditions and performed by the same experienced operator-researcher. After adapting to the room conditions (approximately 15 minutes) in the standing position, participants completed a protocol divided into three phases: five minutes baseline recordings in a stable standing position with parallel feet (phase I); one minute of comfortable isometric plantar flexion of both feet (phase II); five minutes recovery from movement, returning to the baseline position (phase III). Blood perfusion was continuously measured in both feet simultaneously using non-invasive technology, specifically, laser Doppler flowmetry (LDF) (Perimed PF5010 System, Stockholm, Sweden) and polarised spectroscopy (PSP) via Tissue Viability Imaging® (TiVi) (TiVi701cam, WheelsBridge, Sweden). The LDF detects cutaneous blood perfusion (BP) variations through the Doppler effect (3,37). For this study, LDF probes were placed in the anterointernal region of each foot, one centimeter posterior to the first metatarsal-phalangeal joint (Figure 1).

The polarized spectroscopy system includes a digital camera equipped with polarized filters placed perpendicular to the skin, without contact, to record and analyse changes in the Concentration of Red Blood Cells (CRBC) in a relatively large chosen region of interest (ROI) (38). The chosen ROI was the dorsal region of both feet. Figure 2 shows a typical blood perfusion record obtained under these conditions. Pulse rate (PR) and arterial blood pressure were also monitored with a digital sphygmomanometer (Pic 22012000200 Esfigm Classic Check, Artsana S.p.A, Italy).

Experimental

As medições foram realizadas no laboratório com condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C), luz e humidade (40-60%) e realizadas pelo mesmo experiente investigador. Após adaptação às condições da sala (aproximadamente 15 minutos) na posição ortostática, os participantes completaram um protocolo dividido em três fases: cinco minutos de medição de valores de base em posição ortostática estável com os pés paralelos (fase I); um minuto de flexão plantar isométrica confortável de ambos os pés (fase II); cinco minutos de recuperação do movimento, retornando à posição inicial (fase III). A perfusão sanguínea foi medida continuamente em ambos os pés simultaneamente usando tecnologia não invasiva, especificamente, fluxometria de laser Doppler (LDF) (Perimed PF5010 System, Estocolmo, Suécia) e espectroscopia polarizada (PSP) com o Tissue Viability Imaging® (TiVi) (TiVi701cam, WheelsBridge, Suécia). O LDF detecta variações da perfusão sanguínea (PA) cutânea através do efeito Doppler (3,37). Para este estudo, as sondas de LDF foram colocadas na região ântero-interna de cada pé, um centímetro posterior à primeira articulação metatarsofalângica (Figura 1).

O sistema de espectroscopia polarizada inclui uma câmara digital equipada com filtros polarizados colocados perpendicularmente à pele, sem contato, para registrar e analisar alterações na Concentração de Glóbulos Vermelhos (CRBC) em uma região de interesse escolhida (ROI) relativamente grande (38). A ROI escolhida foi a região dorsal de ambos os pés. A Figura 2 mostra um registro típico de perfusão sanguínea obtido nestas condições. A frequência de pulso (PR) e a pressão arterial também foram monitoradas com um esfigmomanômetro digital (Pic 22012000200 Esfigm Classic Check, Artsana S.p.A, Itália).

Figure 1 - Schematic representation of foot regions used for data collection (a) by a laser Doppler flowmetry probe and (b) by non-contact polarized spectroscopy (see text).

Figura 1 - Representação esquemática das regiões do pé usadas para recolha de dados (a) por uma sonda de fluxometria de laser Doppler e (b) por espectroscopia polarizada sem contato (ver texto).



Statistical Analysis

Descriptive and comparative statistics were performed with SPSS v.22.0 (IBM Corp. Amrock, NY, USA) and Jamovi software Version 2.2 (jamovi project, Sydney, AU). A 95% level of confidence was adopted throughout the analysis. The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of data distribution. The Student's t-test or the Mann-Whitney non-parametric test was used to assess differences for independent samples. Following normality and homogeneity testing, pairwise comparisons between feet were performed with Repeated Measures ANOVA with the post-hoc Tukey test to evaluate differences among variables. A post-hoc power analysis using the Jamovi software was also performed.

Análise estatística

A estatística descritiva e comparativa foi realizada recorrendo ao SPSS v.22.0 (IBM Corp. Amrock, NY, EUA) e ao software Jamovi Versão 2.2 (projeto jamovi, Sydney, AU). Adotou-se um nível de confiança de 95% ao longo da análise. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade da distribuição dos dados. O teste t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para avaliar as diferenças para amostras independentes. Após testes de normalidade e homogeneidade, as comparações pareadas entre os pés foram realizadas com o ANOVA para Medidas Repetidas e com o teste post-hoc de Tukey para avaliar as diferenças entre as variáveis. Foi também realizada uma análise de potência post-hoc usando o software Jamovi.

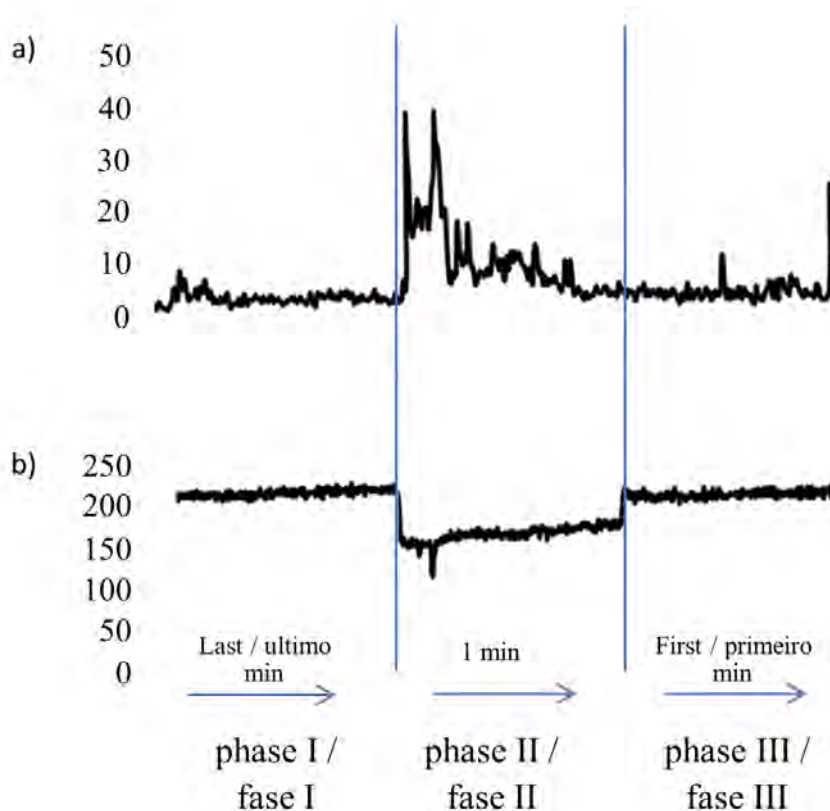


Figure 2 - Illustrative example of typical perfusion records obtained under our experimental conditions in one participant's feet - (a) LDF Blood Perfusion (b) PSp Concentration of Red Blood Cells (see text)
Figura 2 - Exemplo ilustrativo dos registros de perfusão típicos obtidos sob as nossas condições experimentais nos pés de um participante - (a) Perfusão Sanguínea LDF (b) Concentração PSp de Glóbulos Vermelhos (ver texto)

Table 2 - Perfusion differences between feet and across phases (n=16; p-value – Repeated Measures ANOVA, with Tukey post-hoc). LDF values are expressed in blood perfusion (arbitrary) units while PSp values are expressed in CRBC (concentration of red blood cells) arbitrary units. Presented values are mean \pm (SD) (*p < 0.05).

Tabela 2 - Diferenças de perfusão entre os pés e entre as fases (n=16; valor de p – ANOVA de medidas repetidas, com post-hoc de Tukey). Os valores de LDF são expressos em unidades de perfusão sanguínea (arbitrárias), enquanto os valores de PSp são expressos em unidades arbitrárias de CRBC (concentração de glóbulos vermelhos). Os valores apresentados são a média \pm (DP) (*p < 0,05).

	LDF			PSp		
	Right foot / Pé direito	Left foot / Pé esquerdo	p-value*	Right foot / Pé direito	Left foot / Pé esquerdo	p-value*
phase I / fase I	11.42 \pm (3.13)	10.80 \pm (4.31)	0.987	206.1 \pm (32.31)	199.2 \pm (29.40)	0.425
phase II / fase II	18.81 \pm (6.98)	17.03 \pm (6.77)	0.958	184.7 \pm (34.62)	180.5 \pm (35.01)	0.883
phase III / fase III	11.60 \pm (3.11)	10.88 \pm (5.84)	0.997	211.7 \pm (37.36)	203.8 \pm (35.50)	0.225
p-value \downarrow	< 0.001*	< 0.001*		< 0.001*	< 0.001*	

Results

Blood perfusion values for both feet are shown in Table 2, using mean and standard deviation (SD) for all variables representing the totality of each period register. Results of the comparison analysis (*p-value*) between feet and across phases are also shown (Table 2).

The plantar flexion challenge (phase II) caused obvious and statistically significant blood perfusion changes in both feet, as could be expected. Blood perfusion measured by LDF significantly increased in both feet in phase II, and these differences disappeared in the recovery period. The CRBC index indicated a significant decrease of perfusion in both feet with a reduction of the previously detected perfusion asymmetries (Table 2).

Although not significant, there were different blood perfusion values obtained between paired feet with both (LDF and PSp) instruments. LDF recorded higher in the right foot in 67% of men and 44% of women. These results disagreed with the results of the LPI applied to determine footedness, which depicted a 94% dominance of the right foot for all participants. These perfusion asymmetries between right and left feet were always present in all phases when measured by LDF, more or less pronounced although not statistically significant (Figure 3).

Resultados

Os valores de perfusão sanguínea de ambos os pés são apresentados na Tabela 2, utilizando a média e o desvio padrão (DP) para todas as variáveis que representam a totalidade de cada registo em período. Os resultados da análise de comparação entre os pés e entre as fases (p) também são mostrados (Tabela 2).

O desafio da flexão plantar (fase II) causou alterações estatisticamente significativas na perfusão sanguínea em ambos os pés, como esperado. A perfusão sanguínea medida por LDF aumentou significativamente em ambos os pés na fase II, e essas diferenças desapareceram no período de recuperação. O índice CRBC indicou diminuição significativa da perfusão em ambos os pés com redução das assimetrias de perfusão previamente detectadas (Tabela 2).

Detectámos diferentes valores de perfusão sanguínea entre os pares de pés medidos com os dois instrumentos (LDF e PSp) embora não significativos. O LDF registrou ser maior no pé direito em 67% dos homens e 44% das mulheres. Esses resultados discordaram dos resultados do LPI aplicado para determinar a preferência de pé, que mostrou uma dominância de 94% do pé direito para todos os participantes. Essas assimetrias perfusionais entre os pés direito e esquerdo sempre estiveram presentes de modo mais ou menos pronunciadas em todas as fases, quando medidas pelo LDF embora sem significado estatístico (Figura 3)

Percentage differences between phases for both limbs and technologies are presented in Table 3. As shown, the LDF system detects higher perfusion amplitude differences compared with PSp. No differences between limbs were found, indicating that the plantar flexion induces the same response in both limbs. Exploratory tests to assess these delta differences between different age groups were also performed. The delta between phase II and III measured by the PSp for both limbs was significantly lower in the more mature adults ($p=0.019$ right foot; $p=0.027$ left foot), suggesting that age might influence the response. However, we should emphasize that due to the low number of participants these differences must be interpreted with caution and should be better explored in future studies with different design.

As diferenças percentuais entre as fases para ambos os membros e tecnologias são apresentadas na Tabela 3. Conforme apresentado, o sistema LDF detecta maiores diferenças de amplitude de perfusão em comparação com PSp. Não foram encontradas diferenças entre os membros, indicando que a flexão plantar induz a mesma resposta em ambos os membros. Testes exploratórios para avaliar estas diferenças entre faixas etárias também foram realizados. O delta entre as fases II e III medido pelo PSp para ambos os membros foi significativamente menor nos adultos mais velhos ($p=0,019$ pé direito; $p=0,027$ pé esquerdo), sugerindo que a idade pode influenciar a resposta. No entanto, devemos enfatizar que, devido ao baixo número de participantes, essas diferenças devem ser interpretadas com cautela, devendo ser melhor exploradas em estudos futuros.

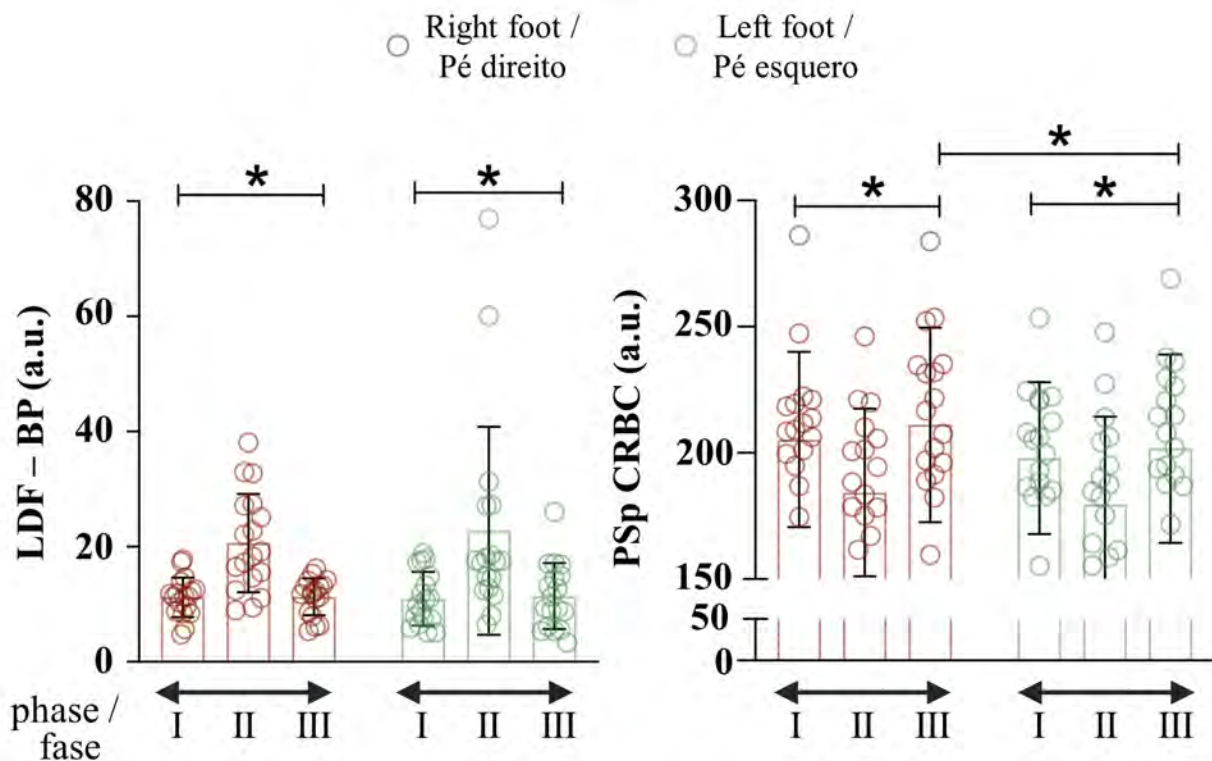


Figure 3 - Comparison of median perfusion values detected between right and left foot by LDF (blood perfusion) and PSp_concentration of red-blood cells (CRBC) during the experimental protocol ($n=16$). Pairwise comparisons between feet were performed with Repeated Measures ANOVA with the post-hoc Tukey test ($*p < 0.05$).

Figura 3 - Comparação dos valores medianos de perfusão detectados entre o pé direito e esquerdo por LDF (perfusão sanguínea) e PSp_concentração de glóbulos vermelhos (CRBC) durante o protocolo experimental ($n=16$). As comparações pareadas entre os pés foram realizadas com ANOVA de Medidas Repetidas com o teste post-hoc de Tukey ($*p < 0,05$).

Discussion

Our objective in the presented experimental setting was to characterise the impact of isometric plantar flexion of both feet, in an upright position, on blood perfusion.

Baseline analysis immediately revealed asymmetric blood perfusion between right and left feet, although not statistically significant (Table 2). Asymmetries have been described as differences between right and left, dominant and nondominant, preferred and nonpreferred or stronger and weaker limbs (39-41). Also referred to as footedness (or handedness for the upper limb), it reveals a complex aspect of human performance and cognitive-motor processes (39). In the absence of vascular disease, the physiological meaning of these asymmetries is far from being fully understood, but recent evidence suggests it to be particularly relevant in sports medicine. Footedness has been classified as a lesion risk factor for the preferred foot in the lower extremity (40,42) and is likely to be considered in the design of training or recovery programs. Despite the relevancy of this information, most of the procedures are used by convenience, and this lack of normalisation complicates the comparison of results and the determination of any true meaning (39,43). Additionally, some studies have associated blood flow with muscle mass (40,41), suggesting that circulatory stress might produce more asymmetries and promote muscle-perfusion lesions (40,43). Hemodynamics, muscle activation, and force generation have been proposed as explanations for this scale of strength or force competence between the paired limbs (40,43-46).

Under this view, the self-report limb preference to execute specific tasks seems to represent a poor indicator for this assessment. As previously mentioned, the Portuguese version of the LPI revealed a 94% dominance of the right foot for all participants. However, using LDF perfusion as a (reliable) biological marker (39,43,47) indicated higher perfusion in the right foot in 67% of men and 44% of women. Recent data has shown that even common activities such as gait require comparable amounts of blood flow for distal muscle activation in dominant and nondominant limbs (43,46). Therefore our results justify this option to establish the limb preference according to the higher blood perfusion values as measured by LDF.

Discussão

O nosso objetivo foi caracterizar no presente contexto experimental, o impacto da flexão plantar isométrica na perfusão de ambos os pés na posição ereta.

A análise inicial revelou imediatamente uma perfusão assimétrica entre os pés direito e esquerdo, embora não estatisticamente significativa (Tabela 2). As assimetrias têm sido descritas como diferenças entre os membros direito e esquerdo, dominante e não dominante, preferido e não preferido ou mais fortes e fracos (39-41). Também conhecido como *footedness* (ou lateralidade quando relativa ao membro superior), este é um aspecto complexo do desempenho humano e dos processos cognitivo-motores (39). Na ausência de doença vascular, o significado fisiológico das assimetrias está longe de ser totalmente compreendido, mas evidências recentes sugerem que seja particularmente relevante na medicina desportiva. A *Footedness* foi classificado como um fator de risco de lesão para o pé preferido no membro inferior (40,42) e é provável que seja considerado no planeamento de programas de treino ou de recuperação. Apesar da relevância desta informação, a maioria dos procedimentos são utilizados por conveniência, e esta falta de normalização dificulta a comparação dos resultados e a compreensão do seu significado (39,43). Alguns estudos associaram o fluxo sanguíneo com a massa muscular (40,41), sugerindo que o stress circulatório pode produzir mais assimetrias e promover lesões de perfusão muscular (40,43). Hemodinâmica, ativação muscular e geração de força têm sido propostas como explicações para essa escala de força ou competência de força entre os pares de membros (40,43-46). Desse ponto de vista o autorrelato da preferência de membro para executar tarefas específicas parece representar um indicador fraco para essa avaliação. Como mencionado anteriormente, a versão em português do LPI revelou uma dominância de 94% do pé direito para todos os participantes. No entanto, usando a perfusão LDF como um marcador biológico (confiável) (39,43,47) indicou maior perfusão no pé direito em 67% dos homens e 44% das mulheres. Dados recentes mostraram que mesmo atividades comuns, como a marcha, requerem quantidades comparáveis de fluxo sanguíneo para ativação muscular distal em membros dominantes e não dominantes (43,46). Portanto, os nossos resultados justificam a opção de estabelecer a preferência do membro de acordo com os maiores valores de perfusão sanguínea medidos pelo LDF.

Table 3 - Percentage difference in both feet between phases, for LDF and PSp. (n=16; p-value – Friedman test with the Durbin-Conover test for pairwise comparisons). Both LDF and PSp differences between phases are expressed percentage. Presented values are median with Q1 and Q3.

Tabela 3 - Diferença percentual em ambos os pés entre as fases, para LDF e PSp. (n=16; valor p – teste de Friedman com teste de Durbin-Conover para comparações pareadas). As diferenças de LDF e PSp entre as fases são expressas em percentagem. Os valores apresentados são medianas com Q1 e Q3.

Delta	Right foot / Pé direito % (Q1; Q3)	Left foot / Pé esquerdo % (Q1; Q3)	p-value
Δ LDF phase II - phase I / fase II - fase I	51.8 (19.7; 106.3)	63.2 (40.7; 127.2)	0.801
Δ LDF phase III - phase II / fase III - fase II	-39.9 (-49.7; -20.2)	-37.5 (-60.0; -23.3)	0.654
Δ LDF phase III - phase I / fase III - fase I	6.9 (-4.8; 15.1)	5.2 (-4.2; 19.8)	0.765
Δ PSp phase II - phase I / fase II - fase I	-10.0 (-13.7; -4.0)	-7.5 (-14.9; -2.2)	0.785
Δ PSp phase III - phase II / fase III - fase II	14.5 (6.4; 16.8)	13.0 (5.9; 16.4)	0.683
Δ PSp phase III - phase I / fase III - fase I	2.6 (-2.1; 5.2)	4.9 (-2.2; 6.6)	0.497

Plantar flexion significantly increased blood perfusion as measured by LDF in both feet. Simultaneously, we observed an opposite effect with the PSp instrument, indicating a significant reduction of perfusion measured by CRBC (Table 3, Figure 3). To understand these two observations, we must keep in mind the particular vascular structure of human skin and the technologies used for blood perfusion measurement. The vasculature of the skin is organised in two plexus at different depths parallel to its surface (3). The superficial plexus involves numerous capillary loops that extend to the epidermis connecting small arterioles and venules near the papillary dermis. The lower plexus, near the dermal-hypodermal interface, includes arteries and veins from the underlying muscle and adipose tissue that perforate the fascia to form ascending arterioles and descending venules, connected to the superficial plexus (3). This peculiar structure allows blood to move between these two planes through that anastomosis network (31,48). In addition, the isometric contraction of the calf muscle displaces plantar pressure to the forefoot, facilitating the blood movement to the deeper structure (49,50).

The quantitative measurement of skin blood perfusion is commonly assessed by optical-based technologies, with LDF still regarded as the gold standard. These technologies use different lights and laser frequencies to operate, however, and thus measure at different depths and reveal different features (50). Our own experience supports the information provided by the manufacturer - that these LDF frequencies allow measurements up to 1 mm (50), while the PSp system measures more

A flexão plantar aumentou significativamente a perfusão sanguínea medida pelo LDF em ambos os pés. Simultaneamente, observamos efeito contrário com o instrumento PSp, indicando uma redução significativa da perfusão medida pelo CRBC (Tabela 3, Figura 3). Para entender essas duas observações, devemos ter em mente a estrutura vascular particular da pele humana e as tecnologias utilizadas para a medição da perfusão sanguínea. A vasculatura da pele é organizada em dois plexos em diferentes profundidades paralelas à sua superfície [3]. O plexo superficial envolve numerosas ansas capilares que se estendem até a epiderme, conectando pequenas arteríolas e vênulas próximas da derme papilar. O plexo inferior, próximo da interface dermo-hipodérmica, inclui artérias e veias do músculo subjacente e tecido adiposo que perfuram a fáscia para formar arteríolas ascendentes e vênulas descendentes, ligadas ao plexo superficial (3). Essa estrutura peculiar permite que o sangue se mova entre esses dois planos através dessa rede de anastomoses (31,48). Além disso, a contração isométrica do músculo da perna desloca a pressão plantar para o antepé, facilitando o movimento do sangue para a estrutura mais profunda (49,50).

A quantificação da perfusão sanguínea da pele é comumente avaliada por tecnologias ópticas, sendo o LDF ainda considerado como o padrão de referência. Estas tecnologias utilizam diferentes luzes e frequências de laser, ou sejam medem em diferentes profundidades e revelam diferentes características (50). A nossa experiência corrobora a informação fornecida pelo fabricante de que as frequências de LDF permitem

superficially, likely reaching less than 0.5 mm (38). Considering these arguments, the blood perfusion increase detected by LDF and the blood perfusion decrease detected by PSp are coherent, signifying that plantar flexion is likely displacing blood along the superficial plexus to deeper levels. A previous study has shown that a short-term isometric contraction recruiting a large number of muscular fibres demands an increase in the local blood supply (51). Permanent communication between the lower limb muscle pump and the superficial plantar venous plexus also seems to contribute to these adaptive mechanisms (52). However, this substantial blood perfusion increment registered with the plantar flexion does not result from a local response but rather from the PAHR previously described by our group (28,31,53). Similar adaptive responses were observed in unipodal exercises with the contralateral limb at rest, with blood perfusion modification noted in both active and resting feet (29). Repeated plantar flexion seems to trigger this mechanism, resulting in rapid constriction of the superficial vessels and blood mobilization to the deeper vascular structures. The sustained pressure in the anterior plantar region associated with the posterior (leg) muscular pumping ensures local mechanics and hemodynamics (52). The rapid recovery to baseline values noticed in phase III (when movement ceased and the volunteers returned to a stable upright position) agrees with the previously observed and described mechanisms (26-28).

In our opinion, unsupervised home-based exercise including walking is still an underused and poorly explored therapeutic tool. Recent studies in vascular patients suggested more consistent outcomes with supervised exercise when compared with unsupervised approaches (54). However, results are ambiguous and analysis is still limited by the reduced number of studies and participants (54).

Conclusion

Our results suggest that this easy-to-execute activity, requiring no specialised supervision, might be useful to promote muscular health and, in that direction, to be explored as a component of a person-centred home-based physical activity program. Relevant limitations to be pointed out include that: (i) the observational nature of our study, with a reduced number of participants, limits the extrapolation for the general population, and the identification of the influence of sex, age, and other potential determinants as well; (ii) results were obtained from healthy participants; thus time-related impacts in

medições de até 1 mm (50), enquanto o sistema PSp mede mais superficialmente, atingindo provavelmente menos de 0,5 mm (38). Considerando estes argumentos, o aumento da perfusão sanguínea detectado pela LDF e a diminuição da perfusão sanguínea detectada pela PSp são coerentes, significando que a flexão plantar provavelmente provoca um deslocamento do sangue do plexo superficial para níveis mais profundos.

Um estudo anterior mostrou que uma contração isométrica de curto prazo que recruta um grande número de fibras musculares exigem um aumento no suprimento sanguíneo local (51). A comunicação permanente entre a bomba muscular dos membros inferiores e o plexo venoso plantar superficial também parece contribuir para esses mecanismos adaptativos (52). No entanto, este aumento substancial da perfusão sanguínea registado com a flexão plantar não parece ser resultado de uma resposta local, mas sim da PAHR descrita anteriormente pelo nosso grupo (28,31,53). Respostas adaptativas semelhantes foram observadas em exercícios unipodais com o membro contralateral em repouso, com modificação da perfusão sanguínea observada nos pés ativos e em repouso (29). A flexão plantar repetida parece desencadear este mecanismo, resultando numa rápida constrição dos vasos superficiais e mobilização do sangue para as estruturas vasculares mais profundas. A pressão anterior sustentada na região plantar, associada ao bombeamento muscular posterior (perna) garante a mecânica local e a hemodinâmica (52). A rápida recuperação dos valores basais observados na fase III (quando o movimento cessou e os voluntários retornaram à posição vertical estável) concorda com os mecanismos observados e descritos anteriormente (26-28).

Na nossa opinião, o exercício não supervisionado, incluindo caminhada, realizado no domicílio ainda é uma ferramenta terapêutica subutilizada e pouco explorada. Estudos recentes em pacientes vasculares sugeriram resultados mais consistentes com os exercícios supervisionados quando comparados com abordagens não supervisionadas (54). No entanto, os resultados são ambíguos e a análise ainda é limitada pelo número reduzido de estudos e participantes (54).

Conclusão

Os nossos resultados levam-nos a admitir que esta atividade de fácil execução, sem necessidade de supervisão especializada, pode ser útil para promover a saúde muscular e, nesse sentido, ser explorada

(specific) groups of cardiovascular patients were not established; (iii) experiments were conducted in the laboratory, different from the home-based scenario; (iv) a proper validation of procedures is needed; and (v) the proposed strategy is only applicable to individuals with adequate mobility. As we move forward and expand this research, these limitations will be fully addressed.

Acknowledgements

To all participants, and to all CBIOS researchers involved in the reported studies.

Authors Contributions

Conceptualization, LMR; Data curation, JG and MF; Investigation, MF; Methodology, LMR and MF; Supervision, LMR; Validation, LMR; Writing – original draft, LMR MF and JG; Writing – review & editing, LMR.

Disclosures

The senior editor co-authoring this manuscript had no participation in the review nor in the decision process. All authors declare there were no financial and/or personal relationships that may present a potential conflict of interest.

Funding

This study is supported by FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., by the grants UIDB/04567/2020 and UIDP/ 04567/2020." The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

como componente de um programa de atividade física domiciliada, centrado na pessoa . Limitações relevantes a serem apontadas incluem (i) a natureza observacional do nosso estudo, com número reduzido de participantes, o que limita a extrapolação para a população geral bem como a identificação da influência do sexo, idade e doutros potenciais determinantes; (ii) os resultados foram obtidos em participantes saudáveis pelo que o impacto em grupos (específicos) de pacientes cardiovasculares não foram estabelecidos; (iii) as experiências foram conduzidas em laboratório, o que difere do cenário domiciliado; (iv) é necessária uma validação adequada dos procedimentos; e (v) a estratégia proposta é aplicável apenas a indivíduos com mobilidade. À medida que avançamos e expandimos esta pesquisa, essas limitações deverão ser esclarecidas e ultrapassadas.

Agradecimentos

A todos os participantes e investigadores do CBIOS envolvidos neste estudo.

Declaração e contribuição de autores

Concepção, LMR; Análise de dados, JG e MF; Investigação, MF; Metodologia, LMR e MF; Supervisão, LMR; Validação, LMR; Escrita original, LMR, MF e JG; revisão e edição de escrita, LMR.

Conflito de interesses

O editor senior envolvido 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.

Financiamento

Este estudo é financiado pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., através dos financiamentos UIDB/04567/2020 e UIDP/ 04567/2020. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, recolha e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

References / Referências

- Englesbe, M.J., Lussiez, A.D., Friedman, J.F., Sullivan, J.A., Wang, S.C. (2015). Starting a surgical home. *Annals of Surgery* 262, 901–903. doi: 10.1097/SLA.0000000000001250.
- Posadzki, P., Pieper, D., Bajpai, R., Makaruk, H., Könsgen, N., Neuhaus, A.L., et al. (2020). Exercise/physical activity and health outcomes: an overview of Cochrane systematic reviews. *BMC Public Health*; 20(1), 1724. doi:10.1186/s12889-020-09855-3.
- Cracowski, J. L., & Roustit, M. (2020). Human Skin Microcirculation. *Comprehensive Physiology*, 10(3), 1105–1154. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190008>
- Castell, M.V., Gutiérrez-Misis, A., Sánchez-Martínez, M., Prieto, M.A., Moreno, B., Nuñez, S., et al. & MEFAP Group. (2019) Effectiveness of an intervention in multicomponent exercise in primary care to improve frailty parameters in patients over 70 years of age (MEFAP-project), a randomised clinical trial: rationale and study design. *BMC Geriatrics*; 19(1), 25. doi:10.1186/s12877-018-1024-8.
- de Labra, C., Guimaraes-Pinheiro, C., Maseda, A., Lorenzo, T., Millán-Calenti, J.C. (2015) Effects of physical exercise interventions in frail older adults: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Geriatrics*, 15,154. doi:10.1186/s12877-015-0155-4.
- Criqui, M.H., Matsushita, K., Aboyans, V., Hess, C.N., Hicks C.W., Kwan T.W., et al. & American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. (2021). Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Contemporary Epidemiology, Management Gaps, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 144(9): e171–e191. doi:10.1161/CIR.0000000000001005.
- Howlett, S.E., Rutenberg, A.D., Rockwood, K. (2021). The degree of frailty as a translational measure of health in aging. *Nature Aging*, 1, 651–665. doi:10.1038/s43587-021-00099-3.
- Tern, P., Kujawiak, I., Saha, P., Berrett, T. B., Chowdhury, M. M., & Coughlin, P. A. (2018). Site and Burden of Lower Limb Atherosclerosis Predicts Long-term Mortality in a Cohort of Patients With Peripheral Arterial Disease. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 56(6), 849–856. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2018.07.020>
- Yazdanpanah, L., Nasiri, M., & Adarvishi, S. (2015). Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World journal of diabetes*, 6(1), 37–53. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i1.37>.
- Baroudi, L., Newman, M.W., Jackson, E.A., Barton, K., Shorter, K.A., Cain, S.M. (2020). Estimating Walking Speed in the Wild. *Frontiers in Sports and Active Living*. 2, 583848. doi:10.3389/fspor.2020.583848.
- Dunford, E.C., Valentino, S.E., Dubberley, J., Oikawa, S.Y., McGlory, C., Lonn, E., et al. (2021). Brief Vigorous Stair Climbing Effectively Improves Cardiorespiratory Fitness in Patients With Coronary Artery Disease: A Randomized Trial. *Frontiers in Sports and Active Living*. 3, 630912. doi:10.3389/fspor.2021.630912.
- Smith-Ryan, A.E., Weaver, M.A., Viera, A.J., Weinberger, M., Blue M., Hirsch, K.R. (2021). Promoting Exercise and Healthy Diet Among Primary Care Patients: Feasibility, Preliminary Outcomes, and Lessons Learned From a Pilot Trial With High Intensity Interval Exercise. *Frontiers in Sports and Active Living*. 3:690243. doi:10.3389/fspor.2021.690243.
- Liu, C. K., & Fielding, R. A. (2011). Exercise as an intervention for frailty. *Clinics in geriatric medicine*, 27(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.08.001>
- Colberg, S.R., Sigal, R.J., Fernhall, B., Regensteiner, J.G., Blissmer, B.J., Rubin, R.R., et al. (2010) American College of Sports Medicine, & American Diabetes Association. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care*. 33(12):e147–e167. doi:10.2337/dc10-9990.
- Kluding, P.M., Bareiss, S.K., Hastings, M., Marcus, R.L., Sinacore, D.R., Mueller, M.J. (2017). Physical Training and Activity in People With Diabetic Peripheral Neuropathy: Paradigm Shift. *Physical Therapy*. 97(1): 31–43. doi:10.2522/ptj.20160124.
- Williams, D. T., Price, P., & Harding, K. G. (2006). The influence of diabetes and lower limb arterial disease on cutaneous foot perfusion. *Journal of vascular surgery*, 44(4), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.06.040>
- Polonsky, T.S., McDermott, M.M. (2021). Lower Extremity Peripheral Artery Disease Without Chronic Limb-Threatening Ischemia: A Review. *JAMA*. 325(21), 2188–2198. doi:10.1001/jama.2021.2126.
- Olin, J. W., & Sealove, B. A. (2010). Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management. *Mayo Clinic proceedings*, 85(7), 678–692. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0133>.
- Dekker, J., de Groot, V., Ter Steeg, A.M., Vloothuis, J., Holla, J., Collette, E., Satink, T., Post, L., et al. (2020). Setting meaningful goals in rehabilitation: rationale and practical tool. *Clinical Rehabilitation*. 34(1):3–12. doi:10.1177/0269215519876299.
- Godin, G. (1994). Theories of reasoned action and planned behavior: usefulness for exercise promotion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 26, 1391–1394. doi: 10.1249/00005768-199411000-00014.
- Booth, F. W., Gordon, S. E., Carlson, C. J., & Hamilton, M. T. (2000). Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(2), 774–787. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.2.774>.
- Korkiakangas, E. E., Alahuhta, M. A., & Laitinen, J. H. (2009). Barriers to regular exercise among adults at high risk or diagnosed with type 2 diabetes: a systematic review. *Health promotion international*, 24(4), 416–427. <https://doi.org/10.1093/heapro/dap031>.
- Smolderen, K. G., Hoeks, S. E., Pedersen, S. S., van Domburg, R. T., de Liefde, I. I., & Poldermans, D. (2009). Lower-leg symptoms in peripheral arterial disease are associated with anxiety, depression, and anhedonia. *Vascular medicine (London, England)*, 14(4), 297–304. <https://doi.org/10.1177/1358863X09104658>
- Gerhard-Herman, M.D., Gornik, H.L., Barrett, C., Barshes, N.R., Corriere, M.A, Drachman, D.E., et al. (2017). AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 135(12):e726–e779. doi:10.1161/CIR.0000000000000471.
- Writing Committee Members, Otto, C. M., Nishimura, R. A., Bonow, R. O., Carabello, B. A., Erwin, J. P., 3rd, Gentile, F., Jneid, H., Krieger, E. V., Mack, M., McLeod, C., O’Gara, P. T., Rigolin, V. H., Sundt, T. M., 3rd, Thompson, A., & Toly, C. (2021). 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 77(4), 450–500. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.035>
- Florindo, M., Nuno, S., Rodrigues, L.M. (2019). Studying the human lower limb perfusion dynamics with the step in place model. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 16(2):195-201. doi: 10.19277/bbr.16.2.212.
- Florindo, M., Nuno, S. L., & Rodrigues, L. M. (2022). Lower Limb Dynamic Activity Significantly Reduces Foot Skin Perfusion: Exploring Data with Different Optical Sensors in Age-Grouped Healthy Adults. *Skin pharmacology and physiology*, 35(1), 13–22. <https://doi.org/10.1159/000517906>.
- Nuno, S., Florindo, M., Silva, H., Rodrigues, L.M. (2020). Studying the impact of different body positioning, squatting, and unipodal flexion on perfusion in the lower limb – an exploratory approach complemented with optical spectroscopy (TiVi). *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 17(2):187-196. doi: 10.19277/bbr.17.2.235.

29. Nuno, S., Florindo, M., Rodrigues, L.M. (2020). The unipodal flexion evokes an adaptive microcirculatory reflex in the contralateral foot. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 17(2): 1-294. doi: 10.19277/bbr.17.2.243.
30. Rocha, C., Macedo, A., Nuno, S., Silva, H., Ferreira, H., Rodrigues, L.M. (2018). Exploring the perfusion modifications occurring with massage in the human lower limbs by non-contact polarized spectroscopy. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 15(2):196-204. doi: 10.19277/bbr.15.2.186.
31. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Ferreira, H. T., & Silva, H. N. (2020). Lower limb massage in humans increases local perfusion and impacts systemic hemodynamics. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 128(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00437.2019>.
32. Aboyans, V., Criqui, M.H., Abraham, P., Allison, M.A., Creager, M.A., Diehm, C., et al., (2012). American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 126(24):2890–2909. doi:10.1161/CIR.0b013e318276fbc.
33. Garrow, J. S., & Webster, J. (1985). Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *International journal of obesity*, 9(2), 147–153.
34. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. (1995). *World Health Organization technical report series*, 854, 1–452.
35. Atalaia, T., Abrantes, J., Caldas, A.C. (2015). Cross-cultural adaptation and reliability of the Portuguese version of the Lateral Preference Inventory for the laterality profile assessment. *Salutis Scientia*, 7, 1-15.
36. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20):2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
37. Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G., & Steenbergen, W. (2009). Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in medical science*, 24(2), 269–283. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0524-0>
38. O'Doherty, J., Henricson, J., Anderson, C., Leahy, M. J., Nilsson, G. E., & Sjöberg, F. (2007). Sub-epidermal imaging using polarized light spectroscopy for assessment of skin microcirculation. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 13(4), 472–484. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00253.x>
39. Grouios, G. (2005). Footedness as a potential factor that contributes to the causation of corn and callus formation in lower extremities of physically active individuals. *The Foot*, 15 (3) 54-162. <https://doi.org/10.1016/j.foot.2005.05.003>.
40. Bishop, C., Read, P., Chavda, S., Turner, A. (2016). Asymmetries of the Lower Limb: The Calculation Conundrum in Strength Training and Conditioning. *Strength and Conditioning Journal*, 38(6):27-32. doi:10.1519/SSC.0000000000000264.
41. Rodrigues, L.M., Rocha, C.G., Florindo, M.E., Gregório, J. (2021). Lower Limb Perfusion Asymmetries in Humans at Rest and Following Activity—A Collective View. *Symmetry*, 13(12):2348. <https://doi.org/10.3390/sym13122348>
42. Beynnon, B. D., Murphy, D. F., & Alosa, D. M. (2002). Predictive Factors for Lateral Ankle Sprains: A Literature Review. *Journal of athletic training*, 37(4), 376–380.
43. van Melick, N., Meddeler, B.M., Hoogeboom, T.J., Nijhuis-van der Sanden, M.W.G., van Cingel, R.E.H. (2017). How to determine 89876.
44. Heil, J., Loffing, F., Büsch, D. (2020). The Influence of Exercise-Induced Fatigue on Inter-Limb Asymmetries: a Systematic Review. *Sports Medicine - Open* 6(1):39. doi:10.1186/s40798-020-00270-x.
45. Vaisman, A., Guiloff, R., Rojas, J., Delgado, I., Figueroa, D., & Calvo, R. (2017). Lower Limb Symmetry: Comparison of Muscular Power Between Dominant and Nondominant Legs in Healthy Young Adults Associated With Single-Leg-Dominant Sports. *Orthopaedic journal of sports medicine*, 5(12), 2325967117744240. <https://doi.org/10.1177/2325967117744240>.
46. Maloney S. J. (2019). The Relationship Between Asymmetry and Athletic Performance: A Critical Review. *Journal of strength and conditioning research*, 33(9), 2579–2593. <https://doi.org/10.1519/JSC.00000000000002608>
47. Rodrigues, L. M., Nuno, S. L., Granja, T., Florindo, M. E., Gregório, J., & Atalaia, T. (2022). Perfusion, Stance and Plantar Pressure Asymmetries on the Human Foot in the Absence of Disease—A Pilot Study. *Symmetry*. 14(3), 441. <https://doi.org/10.3390/sym14030441>
48. Carter, S.J., Hodges, G.J. (2011). Sensory and sympathetic nerve contributions to the cutaneous vasodilator response from a noxious heat stimulus. *Exp Physiol*. 96(11):1208-1217. doi: 10.1113/expphysiol.2011.059907.
49. Bergstrand, S., Lindberg, L.G., Ek, A.C., Linde, M., Lindgren, M. (2009). Blood flow measurements at different depths using photoplethysmography and laser Doppler techniques. *Skin Research and Technology*, 15, 139–147 doi: 10.1111/j.1600-0846.2008.00337.x
50. Rodrigues, L. M., Rocha, C., Ferreira, H., & Silva, H. (2019). Different lasers reveal different skin microcirculatory flowmotion - data from the wavelet transform analysis of human hindlimb perfusion. *Scientific reports*, 9(1), 16951. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53213-2>
51. Richards, J. C., Crecelius, A. R., Kirby, B. S., Larson, D. G., & Dinunno, F. A. (2012). Muscle contraction duration and fibre recruitment influence blood flow and oxygen consumption independent of contractile work during steady-state exercise in humans. *Experimental physiology*, 97(6), 750–761. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.062968>
52. Broderick, B. J., Corley, G. J., Quondammatteo, F., Breen, P. P., Serrador, J., & Ólaighin, G. (2010). Venous emptying from the foot: influences of weight bearing, toe curls, electrical stimulation, passive compression, and posture. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 109(4), 1045–1052. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00231.2010>
53. Florindo, M., Nuno, S., Andrade, S., Rocha, C., Rodrigues, L.M. (2021). The acute modification of the upper-limb perfusion in vivo evokes a prompt adaptive hemodynamic response to re-establish cardiovascular homeostasis. *Physiology21 Annual Conference Abstract Book*. available at <https://static.physoc.org/app/uploads/2021/06/10115155/Physiology-2021-Abstract-Book.pdf>
54. Hageman, D., Fokkenrood, H. J., Gommans, L. N., van den Houten, M. M., & Tejjink, J. A. (2018). Supervised exercise therapy versus home-based exercise therapy versus walking advice for intermittent claudication. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD005263. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005263.pub4>

Do community pharmacy workers know how to use adrenaline autoinjectors?

Os profissionais das farmácias comunitárias sabem utilizar autoinjectores de adrenalina?

Ana Margarida Mesquita*, Ricardo Moço Coutinho, José Luís Plácido, Alice Coimbra

Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar e Universitário de São João, EPE, Porto, Portugal

* corresponding author / autora para correspondência: mesquita.amb@gmail.com

Abstract

Adrenaline is the first line and most effective treatment of anaphylaxis and should be administered as soon as possible. Professionals in community pharmacies (pharmacists and pharmacy technicians) dispense adrenaline autoinjectors to allergic patients and could have a crucial role in reinforcing training regarding the use of these devices.

A survey to pharmacy workers was conducted in pharmacies located in the north of Portugal. The same professionals were invited to simulate adrenaline administration with training devices of the two autoinjectors available in Portugal.

The majority of the pharmacy workers reported not having training regarding adrenaline autoinjectors and more than a third were unable to correctly demonstrate adrenaline administration with the trainer devices.

Pharmacy workers in community pharmacies could have an essential role in reinforcing patient education. Consequently, it is important to encourage and ensure their training in order for them to provide clearer and more detailed instructions to patients.

Keywords: adrenaline autoinjector; anaphylaxis; community pharmacies; allergy; knowledge

Resumo

A adrenalina é o tratamento de primeira linha da anafilaxia e deve ser administrada o mais rapidamente possível. Os profissionais das farmácias comunitárias (farmacêuticos e técnicos de farmácia) dispensam autoinjectores de adrenalina (AIA) aos doentes alérgicos e poderiam ter um papel extremamente importante no reforço do ensino da administração destes dispositivos.

Neste estudo, foi realizado um questionário a profissionais de farmácias comunitárias em cidades do Norte de Portugal. Os mesmos profissionais foram convidados a simular a administração de adrenalina com dispositivos de treino dos dois autoinjectores disponíveis em Portugal.

A maioria dos inquiridos referiram não ter tido formação acerca dos AIA e mais de um terço não conseguiram administrar corretamente os dispositivos de treino.

Os profissionais das farmácias comunitárias podem ter um papel essencial no reforço da educação dos doentes. Consequentemente, é importante incentivar e garantir a sua formação, de modo a fornecerem instruções mais claras e minuciosas aos doentes.

Palavras-chave: autoinjector de adrenalina; anafilaxia; farmácia comunitária; alergia; conhecimento

Introduction

Anaphylaxis is a severe and potentially fatal hypersensitivity reaction. Regardless of the cause, the diagnosis is clinical (1) and should be considered highly probable in the presence of at least one of the following three clinical criteria: sudden onset with skin and/or mucosal involvement and at least one of the following: respiratory involvement or hypotension or associated symptoms; rapid occurrence of two or more of the following after exposure to a probable allergen: skin and/or mucosal involvement, respiratory involvement, hypotension or associated symptoms, or sudden and persistent gastrointestinal symptoms; hypotension after exposure to an allergen known to the patient (2).

Adrenaline is the first line and the most effective treatment and it should be administered as early as possible. It is available as an ampoule or as an adrenaline autoinjector (AAI), the goal of the latter being to facilitate self-administration (3). Patients with a history of anaphylaxis should be referred to an Allergy and Clinical Immunology consultation and may be prescribed an AAI (1).

According to the national anaphylaxis registry of the Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), between 2007 and 2017, 1049 patients were prescribed AAI out of the 1783 reported (1). These data show that AAI are underrepresented in clinical practice (3,4).

Two AAI are available in Portugal, Epipen® (Viatris™) and Anapen® (Lincoln Medical Ltd), in two dosages 0.15 and 0.3 mg.

The correct technique for the use of an AAI should always be demonstrated at the time of its prescription. The patient should be provided with a written emergency plan indicating the warning symptoms, the medication that should be used, and how the AAI should be used. SPAIC created an illustrative document for an anaphylaxis emergency plan that includes all the above items (5). The patient's proficiency (in its use) should always be confirmed following training. All these procedures are in accordance with the international standards of the National Institute for Health and Care Excellence (6).

Pharmacists and pharmacy technicians that dispense these devices could also play a major role in patient education (7). Therefore, they should be aware of the available AAI and know how to use them correctly.

Introdução

A anafilaxia é uma reacção de hipersensibilidade grave e potencialmente fatal. Independentemente do seu mecanismo causal, o diagnóstico é clínico (1) e deve ser considerado muito provável na presença de pelo menos um dos três critérios clínicos seguintes: início súbito com envolvimento da pele e/ou mucosas e pelo menos um dos seguintes: compromisso respiratório ou hipotensão ou sintomas associados; ocorrência de dois ou mais dos seguintes, rapidamente após exposição a um alérgico provável para o doente: envolvimento da pele e/ou mucosas, compromisso respiratório, hipotensão ou sintomas associados ou sintomas gastrintestinais súbitos e persistentes; hipotensão após exposição a um alérgico conhecido para o doente (2).

O tratamento de primeira linha é a adrenalina, que deve ser administrada o mais precocemente possível. Está disponível como ampola ou autoinjetor de adrenalina (AIA), tendo este dispositivo o objectivo de facilitar a sua administração (3). Os doentes com história de anafilaxia devem ser referenciados à consulta de Imunoalergologia e podem ter indicação para ser portadores de um AIA (1).

Segundo o registo nacional de anafilaxia da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), entre 2007 e 2017 foram prescritos AIA a 1049 doentes de 1783 reportados (1). Estes dados mostram que os AIA estão sub-representados na prática clínica (3,4).

Em Portugal estão disponíveis dois AIA, Epipen® (Viatris™) e Anapen® (Lincoln Medical Ltd), na dose de 0,15 e 0,3 mg.

A técnica correta de utilização de um AIA deve sempre ser demonstrada no momento da sua prescrição. Deve ser fornecido ao doente um plano de emergência escrito onde estão indicados os sintomas de alerta, a medicação que deve ser utilizada e como deve ser usado o AIA. A SPAIC criou um folheto ilustrativo do plano de emergência na anafilaxia que compreende todos os itens referidos anteriormente (5). Após o ensino deve sempre ser verificada a aprendizagem do doente. Todos estes procedimentos estão de acordo com as normas internacionais do National Institute for Health and Care Excellence (6).

Os farmacêuticos e os técnicos de farmácia, que dispensam estes dispositivos, podem também desempenhar um papel importante na educação e ensino destes doentes (7). Por isso, estes profissionais deveriam conhecer e saber utilizar os AIA disponíveis.

A German study concluded that only 1 in 5 pharmacies provided patients with detailed information about AAI and 70% of the pharmacists stated that they were not interested in receiving training (4). An Australian study reported that pharmacists have acceptable rates of Epipen® and Anapen® demonstration accuracy, but there was room for improvement (7).

The aim of this study was to determine the knowledge and the ability to demonstrate the correct use of AAI by pharmacists and pharmacy technicians.

Material and Methods

Between May 2018 and July 2019, a questionnaire was administered in community pharmacies in the north of Portugal. The selection was made according to the geographical proximity to Centro Hospitalar Universitário de São João, and a total of 17 pharmacies were willing to participate. The professionals present at the time of the visit (pharmacists and pharmacy technicians), who gave their consent to be part of the study, completed an anonymous questionnaire (Figure 1), on paper, which included questions about their general knowledge of AAI, their experience in providing them, training on how to use them and their own opinion about their level of self-confidence for instructing patients.

The questionnaire was developed by the authors exclusively for this study and was not submitted to a validation process. All pharmacists and pharmacy technicians who answered the questionnaire were then invited to simulate the administration of adrenaline with both training devices of the two AAI available in Portugal. The simulation was evaluated by the authors according to the indications for use provided by the manufacturers (8,9) and classified into one of three categories: unable to demonstrate adrenaline injection with the AAI, able to demonstrate adrenaline injection with the AAI but with small mistakes in the demonstration or full demonstration without mistakes. Subsequently, the correct technique of administration of these devices was shown to the participants.

IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0, was used to perform statistical analysis, mostly descriptive, and the chi-square test was used for comparisons. Results were considered statistically significant for p-values less than 0.05.

Um estudo alemão concluiu que apenas 1 em cada 5 farmácias forneciam informação detalhada sobre AIA e 70% dos farmacêuticos afirmavam não estar interessados em receber formação (4). Um estudo australiano relatou que os farmacêuticos têm taxas aceitáveis da correta demonstração do uso da Epipen® e da Anapen®, mas com espaço para melhorias (7).

O objectivo deste estudo foi verificar o conhecimento e a capacidade de demonstração da utilização dos AIA de farmacêuticos e técnicos de farmácia.

Material e Métodos

Entre maio de 2018 e julho de 2019 foi realizado um questionário em farmácias comunitárias do Norte de Portugal. A selecção das farmácias foi feita de acordo com a proximidade geográfica ao Centro Hospitalar Universitário de São João, tendo aceite a participar um total de 17 farmácias. Os profissionais presentes no momento da visita (farmacêuticos e técnicos de farmácia), que deram o seu consentimento para fazer parte do estudo, preencheram um questionário anónimo (Figura 1), em papel, que incluía questões gerais sobre o conhecimento acerca dos AIA, a experiência prévia de venda, se tiveram formação sobre a técnica de utilização e a opinião sobre o nível de autoconfiança para instruir os doentes na sua utilização.

O questionário foi desenvolvido pelos autores apenas para este estudo e não foi submetido a um processo de validação. Todos os farmacêuticos e técnicos de farmácia que responderam ao questionário foram depois convidados a simular a administração de adrenalina com ambos os dispositivos de treino dos dois AIA disponíveis em Portugal. A simulação foi avaliada pelos autores de acordo com as indicações de utilização fornecidas pelos fabricantes (8,9) e classificada em uma de três categorias: incapaz de demonstrar injeção de adrenalina com o AIA, capaz de demonstrar injeção de adrenalina com o AIA mas com pequenos erros na demonstração ou demonstração completa sem qualquer erro. Posteriormente foi feito o ensino da técnica correta de administração destes dispositivos aos participantes.

O IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0, foi utilizado para efectuar a análise estatística, maioritariamente descritiva, tendo o teste qui-quadrado sido utilizado para comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para um valor de *p* inferior a 0,05.

Results

A total of 53 questionnaires were included. Forty (75%) participants were female, the median age was 36 years (interquartile range 21) and 34 (64%) were pharmacists. Of the total, 47 (89%) knew the name of at least one AAI and 31 (65%) were able to name both. Forty-seven (89%) stated having no previous training

Resultados

Foram incluídos 53 questionários. Quarenta (75%) participantes eram do sexo feminino, a idade média era de 36 anos (intervalo interquartil 21) e 34 (64%) eram farmacêuticos. Do total dos participantes, 47 (89%) sabiam o nome de pelo menos um AIA e 31 (58%) conseguiram nomear os dois autoinjectores. Quarenta

QUESTIONÁRIO - AUTOINJECTORES DE ADRENALINA (AIA)

FARMÁCIA: _____ **Data:** ___ / ___ / 2018

1. Idade: ____ anos

2. Sexo: Feminino Masculino

3. Profissão: Farmacêutico/a Técnico/a de farmácia

4. Conhece algum autoinjeter (AIA) / caneta de adrenalina? Sim Não

4.1. Se SIM, qual? Anapen® Epipen®

5. Existe algum AIA / caneta de adrenalina na vossa farmácia? Sim Não

5.1. Se SIM, qual(ais): Anapen® Epipen® Ambas

5.1.1. Qual a mais vendida na sua farmácia? Anapen® Epipen®

5.1.2. Quando é que foi a última vez que vendeu uma AIA? _____

5.1.2.1. Qual? Anapen® Epipen®

5.2. Se NÃO, por favor indique o motivo:

6. Alguma vez fez formação sobre como usar AIA? Sim Não

6.1. Se SIM, por favor indique como / onde ?

Durante o curso Formação Folheto informativo Internet

Outro _____

7. Alguma vez ensinou um doente a usar o AIA? Sim Não

7.1. Se assinalou SIM, quando é que foi a última vez _____

7.2. Qual? Anapen® Epipen®

7.3. Quantas vezes terá feito ensinios de AIA? _____

8. Qual é que acha mais fácil de usar/explicar? Anapen® Epipen®

Figure 1 - Questionnaire applied in community pharmacies. (An English translation is available as an Appendix)
Figura 1 - Questionario aplicado aos profissionais das farmácias comunitárias. (Uma tradução inglesa está disponível como um Apêndice.)

Table 1 - Characterization of the study sample.**Tabela 1** - Caracterização da amostra do estudo.

n = 53 participants / participantes (17 pharmacies / farmácias)

Female / Feminino, n (%)	40 (75%)			
Pharmacist / Farmacêutico, n (%)	34 (64%)			
Age, median / Idade, mediana (IQ)	36 (21%)			
		Anapen®	Both / Ambos	Epipen®
Know AAI / Conhece AIA, n (%)	47 (89%)	13 (25%)	31 (58%)	3 (6%)
Sold AAI / Vendeu AIA, n (%)	37 (70%)	23 (43%)		14 (26%)
Teaching / Ensinou, n (%)	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)	
Training on AAI / Formação sobre AIA , n (%)	6 (11%)			

Abbreviations: AAI - adrenaline autoinjectors / Abreviaturas: AIA – autoinjectores de adrenalina.

or information on how to use an AAI. Thirty-seven (70%) reported they had dispensed at least one AAI and only 3 (6%) confirmed having previously instructed a patient on their use. (Table 1) Thirty-eight (72%) stated they had no idea which AAI would be easier to use or to teach.

Concerning the demonstration on how to use an AAI with the trainers, 26 (49%) professionals were not able to demonstrate adrenaline administration with the Anapen® trainer and 20 (38%) with the Epipen® trainer. Sixteen (30%) with Anapen® and 24 (45%) with Epipen® correctly demonstrated how to inject adrenaline with the trainers but did not massage the injection site (as indicated in the manufacturer's instructions (8,9)). Eleven (21%) managed to accurately simulate the complete and correct procedure with the Anapen® and 9 (17%) with the Epipen® trainer (Figure 2).

In the group of the participants that mentioned knowing Anapen®, 20 (45%) were unable to administer adrenaline, as were 10 (29%) in the group of those who were familiar with Epipen®.

Of the three professionals who claimed to have already taught at least one patient, one reported having taught both devices and demonstrated the correct technique of use with both. The remaining two reported having taught only Anapen® but were unable to simulate adrenaline injection with the respective trainer.

e sete (89%) afirmaram não ter formação prévia ou informação sobre como utilizar um AIA. Trinta e sete (70%) responderam que já tinham vendido pelo menos um AIA e apenas 3 (6%) afirmaram já terem instruído um doente sobre a sua utilização (Tabela 1). Trinta e oito (72%) disseram não ter ideia de qual o AIA que seria mais fácil de utilizar ou de ensinar.

Relativamente à demonstração da utilização de um AIA com os dispositivos de treino, 26 (49%) profissionais não conseguiram demonstrar a autoadministração com a Anapen® e 20 (38%) com a Epipen®. Dezasseis (30%) demonstraram corretamente como administrar adrenalina com a Anapen® e 24 (45%) com a Epipen®, mas não massajaram o local da injeção (como indicado nas instruções do fabricante (8,9)). Onze (21%) conseguiram simular o procedimento completo com o simulador da Anapen® e 9 (17%) com o da Epipen® (Figura 2).

No grupo dos inquiridos que referiram conhecer a Anapen®, 20 (45%) não conseguiram realizar a administração da adrenalina e no grupo dos que conheciam a Epipen®, 10 (29%) não foram capazes.

Dos 3 profissionais que afirmaram já ter ensinado pelo menos um doente, um deles reportou ter feito o ensino de ambos os dispositivos e demonstrou a técnica correta de uso com os dois. Os restantes 2 referiram ter ensinado apenas a Anapen®, mas não conseguiram simular injeção de adrenalina com o dispositivo de treino respetivo.

No statistically significant differences were found between pharmacists and pharmacy technicians in relation to the administration technique and no differences were found when comparing the injection simulation with both AAI. Forty-four (83%) participants considered the Epipen® easier to use and to teach after the demonstration of the correct procedure.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the only study conducted in Portugal that assesses the level of knowledge of community pharmacy professionals, including pharmacists and pharmacy technicians, about the (patient's) proper use of AAI. Despite the differences in training, function, and responsibilities between the two classes, the authors considered it important to include all professionals who dispense these devices.

According to a study performed in 2016, whose objective was to assess the ability of patients to use the AAI prescribed to them, more than one third were unable to do so correctly (10). This demonstrates that there still is much work to be done in patient education.

Previous study also indicate that teaching by repetition increases the capacity for learning and contributes to retention of the acquired knowledge for longer periods of time (11). These studies concerning memory formation lead us to believe that more instruction moments of the AAI administration technique can improve patient learning. With this in mind, community pharmacy professionals can become an additional opportunity to reinforce the education of these patients.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre farmacêuticos e técnicos de farmácia relativamente à técnica de administração e não foram encontradas diferenças quando comparada a simulação da injeção com os dois AIA. Quarenta e quatro (83%) participantes consideraram que a Epipen® seria mais fácil de usar e ensinar, após a demonstração.

Discussão

Tanto quanto sabemos, este é o único estudo realizado em Portugal que avalia o nível de conhecimento dos profissionais das farmácias comunitárias sobre os AIA e que inclui farmacêuticos e técnicos de farmácia. Apesar da formação, funções desempenhadas e responsabilidade serem distintas nas duas classes, os autores consideraram importante incluir todos os profissionais que dispõem estes dispositivos.

De acordo com um trabalho realizado em 2016, cujo objetivo foi avaliar a aptidão dos doentes para utilizarem os AIA que lhes tinham sido prescritos, verificou-se que mais de um terço eram incapazes de o fazer corretamente (10). Isto demonstra que existe ainda muito trabalho a ser feito na educação destes doentes.

Está descrito que o ensino por repetição aumenta a capacidade de aprendizagem e permite manter o conhecimento adquirido durante mais tempo (11). Estes estudos relativos à formação de memórias levam-nos a pensar que mais momentos de instrução da técnica de administração dos AIA podem melhorar a aprendizagem dos doentes. Tendo isto em conta, os profissionais das farmácias comunitárias podem tornar-se uma oportunidade adicional no reforço da educação destes doentes.

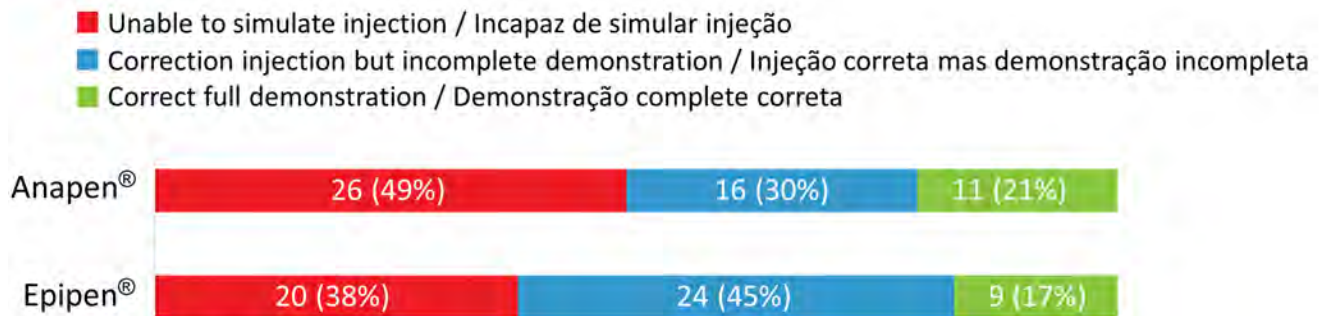


Figure 2 - Evaluation of the demonstration of adrenaline autoinjectors use with training devices.

Figura 2 - Avaliação da demonstração do uso de autoinjetores de adrenalina com dispositivos de treino.

Although approximately 90% reported knowing at least one AAI, the same percentage of participants said they had no previous training on its use.

When the technique of usage of the AAI was evaluated, almost half were not able to simulate the injection with Anapen® and more than a third with Epipen®. It was also found that two participants who reported having taught Anapen® failed to demonstrate the administration. This exposes the gap that exists in the training of pharmacy professionals on AAI independent of their professional class, as no statistically significant differences were found between the two classes regarding the administration technique.

It would be important that the acquisition of knowledge about these devices and the technique for their correct use were included in the academic training plan of these professionals, or that educational programs were created with this purpose. This would create the possibility of teaching moments for patients, specifically at the time of the device dispensation, to avoid errors in the transmission of information.

The authors acknowledge that the limitations of this study include its sample size and its convenience nature due to geographic proximity. The years of professional experience were also not taken into account. Since pharmacies were aware of the visit by the investigators, it should also be considered that some professionals might have tried to acquire knowledge that they otherwise would not have. As future perspectives, it would be interesting to reassess the technique of AAI use among the professionals participating in this study, and to expand the study to different regions of the country to allow for a more representative national sample.

Apesar de aproximadamente 90% referir conhecer pelo menos um AIA, a mesma percentagem de participantes afirmou não ter formação prévia sobre a sua utilização.

Quando foi avaliada a técnica de utilização dos AIA quase metade não foi capaz de simular a injeção com a Anapen® e mais de um terço com a Epipen®. Verificou-se ainda que dois participantes que referiram ter ensinado a Anapen® erraram a demonstração da administração. Estes dados expõem uma lacuna na formação dos profissionais das farmácias sobre AIA, que é independente da classe profissional uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre ambas as classes relativamente à técnica de administração.

Seria importante que a aquisição de conhecimento sobre estes dispositivos e a sua técnica de utilização estivessem incluídas no plano de formação académica destes profissionais ou que fossem criadas ações educativas neste sentido. Isto possibilitaria a existência de momentos de ensino aos doentes, nomeadamente aquando da dispensa, evitando erros na transmissão de informação.

Os autores apontam como limitações do estudo o tamanho da amostra e o facto de se tratar de uma amostra de conveniência por proximidade geográfica. Também não foi tido em conta os anos de experiência profissional. Deve também ter-se em consideração o facto de que havendo aviso prévio de visita à farmácia por parte dos investigadores, alguns dos profissionais podem ter tentado adquirir conhecimento que não teriam de outra forma. Como perspectivas futuras seria interessante reavaliar nos inquiridos a técnica de utilização dos AIA e alargar o estudo para diferentes regiões do país, que permita ter uma amostra nacional mais representativa.

Conclusions

In this group, most pharmacy professionals reported having no training on AAI and the techniques of its use, and more than a third were unable to simulate adrenaline administration with a training device.

It is essential that patients with severe allergic reactions know how to correctly use their AAI. Therefore, it is important that both those who prescribe and those who dispense these devices are completely familiar with them and their proper use in order to give clear and thorough instructions to the patients.

With these results, we conclude that there is still room for improvement in the training of pharmacists and pharmacy technicians on this topic. With such, they could play an essential role in reinforcing patient education whenever dispensing these devices.

Consequently, it is necessary to encourage and ensure the training of these professionals, creating more educational opportunities and raising their awareness of the importance of the correct use of adrenaline autoinjectors to treat anaphylaxis.

Author Contributions Statement

AMM, conceptualization, study design, data analysis, drafting and final writing; RMC, data analysis, drafting and final writing; JLP, revision and supervision; AC, revision and supervision

Funding

none

Conflict of Interests

The authors have no conflict of interests related to this manuscript.

Conclusão

Neste grupo, a maioria dos profissionais das farmácias referiram não ter formação acerca dos AIA e da técnica de utilização e mais de um terço não conseguiram simular a administração de adrenalina com um dispositivo de treino.

É essencial que os doentes com reacções alérgicas graves saibam utilizar corretamente o seu AIA. Sendo assim, seria importante que tanto aqueles que os prescrevem como aqueles que os dispensam estivessem completamente familiarizados com estes dispositivos, de modo a fornecerem instruções mais claras e minuciosas aos doentes.

Com os resultados deste estudo, concluímos que ainda há espaço para melhoria na formação dos farmacêuticos e técnicos de farmácia sobre este assunto. Assim, estes profissionais podem tornar-se mais importantes na formação dos doentes aquando da dispensa destes dispositivos.

Consequentemente, é necessário incentivar e assegurar a sua formação, criando oportunidades educativas e sensibilizando-os para a importância vital da adrenalina para o tratamento da anafilaxia.

Contribuição dos autores

AMM, desenho do estudo, conceitos, análise dos dados, escrita e texto final; RMC, análise de dados, escrita e texto final; JLP, revisão e supervisão; AC, revisão e supervisão.

Financiamento

nenhum

Conflito de interesses

Os autores não têm conflitos de interesses relacionados com este manuscrito.

References / Referências

1. Gaspar A., Santos N., Faria E., Câmara R., Rodrigues-Alves R., Carrapatoso I., Gomes E., Pereira A., Carneiro-Leão L., Morais-Almeida M., Delgado L., Pedro E., Branco-Ferreira M. (2019). Anafilaxia em Portugal: 10 anos de Registo Nacional da SPAIC 2007-2017. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*; 27 (4): 289-307. <http://doi.org/10.32932/rpia.2020.01.023>
2. Pereira A., Gaspar A., Branco-Ferreira M. (2018). Algoritmo de diagnóstico diferencial de anafilaxia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*; 26 (3): 221-228.
3. Esenboga, S., Ocak, M., Cetinkaya, P.G., Sahiner, U.M., Soyer, O., Buyuktiryaki, B., Sekerel, B.E. (2000). Physicians prescribe adrenaline autoinjectors, do parents use them when needed? *Allergologia et Immunopathologia*, 48(1), 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.07.009>.
4. Worm, M., Molaie, N., Dölle, S. (2018). Level of knowledge among pharmacists regarding anaphylaxis and the use of epinephrine autoinjectors. *Deutsche Dermatologische Gesellschaft* 16(11), 1315-1321. <https://doi.org/10.1111/ddg.13679>.
5. <https://www.spaic.pt/publicacoes-folhetos?id=58>
6. Anaphylaxis Quality Standard (2016). National Institute for Health and Care Excellence. <https://www.nice.org.uk/terms-and-conditions#notice-of-rights>.
7. Salter, S.M., Loh, R., Sanfilippo F.M., Clifford R.M. (2014). Demonstration of epinephrine autoinjectors (EpiPen and Anapen) by pharmacists in a randomised, simulated patient assessment: acceptable, but room for improvement; *Allergy Asthma Clinical Immunology*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-49>.
8. © Viatris Inc. All Rights Reserved (2022). How to use an EPIPEN® (epinephrine injection, USP) Auto-Injector. EPI-2020-0273 V3
9. Anapen®. How To Use (reviewed in 2017). Retrieved on January 2022 from <https://www.anapen.com.au/anapen-instruction>
10. Carneiro-Leão, L. et al. (2016) Do patients know how to use adrenaline auto-injectors? *Food Allergy and Anaphylaxis Meeting*, Oral Abstract Session; OP05
11. Zhan, L., Guo, D., Chen, G., Yang, J. (2018). Effects of Repetition Learning on Associative Recognition Over Time: Role of the Hippocampus and Prefrontal Cortex. *Frontiers in Human Neuroscience*. 12, 277. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00277>

Appendix / Apêndice
Questionnaire Translation / Tradução do Questionário

Pharmacy:

Date:

1. Age: years
2. Sex: Female / Male
3. Profession: Pharmacist / Pharmacy Technician
4. Do you know any adrenaline autoinjector / pen (AAI)?
 - 4.1. If YES, which one? Anapen[®] / Epipen[®]
5. Are there adrenaline autoinjectors / pens in your pharmacy?
 - 5.1. If YES, which one(s)? Anapen[®] / Epipen[®] / Both
 - 5.1.1. Which is the most sold in your pharmacy? Anapen[®] / Epipen[®]
 - 5.1.2. When was the last time you sold an AAI?
 - 5.1.2.1. Which one? Anapen[®] / Epipen[®]
 - 5.2. If NO, please indicate the reason:
6. Have you ever had training on how to use an AAI? Yes / No
 - 6.1. If YES, please indicate how / where?
During the (academic) course / (Professional) training / Information leaflet / Internet / Other:
7. Have you ever taught a patient how to use an AAI? Yes / No
 - 7.1. If you indicated YES, when was the last time?
 - 7.2. Which one? Anapen[®] / Epipen[®]
 - 7.3. How many times have you taught the use of an AAI?
8. Which do you think is easier to use / explain? Anapen[®] / Epipen[®]

Ionic exchange membranes in the pharmaceutical industry – Review

Membranas de troca iónica aplicáveis na indústria farmacêutica – Revisão

Ana Morais ^{1,2}, Belen Batanero ², Patrícia Rijo ^{1,3} and Marisa Nicolai ¹

¹CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749–024 Lisboa, Portugal; ²Universidad de Alcalá. Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica. Instituto de Investigación en Química “Andrés M. del Río” (IQAR) Campus Universitario. Fac. Farmacia, km 33,6 A2, 28805 Alcalá de Henares (Madrid) España; ³iMed.Ulissboa – Research Institute for Medicines—R&D Unit at Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisbon, Portugal

*corresponding author / autora para correspondência: marisa.nicolai@ulusofona.pt

Abstract

In line with the longer life expectancy, the pharmaceutical sector, responsible for the continuous development, production and supply of new drugs to cope with the population's healthcare, has been consistently growing. This scenario illustrates the use of some innovative technologies in industrial processes as the major contributing factor. Amongst these technologies, membrane separation technology stands out. This technique affords the filtration and separation of biological molecules at the nanoscale, resulting in a more expedited manufacturing process and a higher purified end product. Depending on the driving force applied, the separation process involves different approaches, feed stages, different pores' sizes or permeates. In the scope of membrane separation technology, electrodialysis (ED) uses an electrical potential difference as the driving force to separate ions based on their charge. In this sense, ion-exchange membranes are the most widely used separation materials in purifying systems as they have the advantage of partitioning species of different charges. The present study evaluates two ion-exchange membranes' aptitude as separators for ED filtration of some industrial chemical processes.

Keywords: Ionic-exchange membranes; separation technology; pharmaceutical industry wastewater treatment; electrodialysis

Resumo

O sector farmacêutico responsável pelo desenvolvimento e produção de medicamentos para fazer face aos cuidados de saúde, tem vindo a crescer paralelamente com o aumento da esperança de vida da população. Esta situação tem como principal fator de contribuição, a aplicação de algumas tecnologias inovadoras utilizadas em processos industriais. Entre estas, destaca-se a tecnologia de separação por membranas. Esta técnica envolve a filtração e separação de moléculas biológicas à escala nano, resultando num processo de fabrico mais expedito, bem como num produto mais puro. No âmbito desta tecnologia de separação, a eletrodialise (ED) utiliza uma diferença de potencial elétrico como força motriz para separar iões de acordo com a sua carga. Neste sentido, as membranas poliméricas de permuta iónica são os materiais de separação mais amplamente utilizados nos sistemas de purificação, uma vez que têm a vantagem de separar espécies de diferentes cargas coexistentes em solução aquosa. O presente estudo avalia a aptidão de duas membranas de permuta iónica como separadores para a filtragem de alguns produtos químicos industriais pelo sistema de ED.

Palavras-chave: Membranas de permuta iónica; tecnologia de separação; tratamento de águas residuais da indústria farmacêutica; eletrodialise

Introduction

According to the National Institute on Aging, (1) the population's average life expectancy has increased significantly over the last hundred years. However, according to the globalisation phenomena associated with the changes from traditional diets to processed food products manufactured on a mass scale and new lifestyle habits, this rise has not been followed by healthy life expectancy.

Although the reliable healthcare provided by technological development in medical and pharmaceutical areas, some harmful unhealthy habits, sedentary lifestyle, and dietary shifts to weaker-nutrition fatty diets are some risk factors contributing to the emergence of some chronic health problems.

Alongside the technological development in medical healthcare, the pharmaceutical industry has been evolving both in more localised therapeutics and into a more complex molecular synthesis approach.

The pharmaceutical industry responsible for the research, manufacturing, and trade of medicines and other healthcare products aims to contend and overpass many of the population's health issues. Therefore, in acquiescence with the globalising and population average life expectancy, the pharmaceutical industry has been likely evolving persistently over the years.

Over time, the aforementioned pharmaceutical development has contributed to the current innovative technologies.

Environmental concerns and current legislation (2) have triggered the demand for high-efficiency industrial processes with concurrently reduced capital commitments, making membrane-based technologies one of the most widely used engineering in the pharmaceutical industry.

These technologies have provided valuable assistance in developing advanced products and great support from an economic point of view in the manufacturing procedure of such outputs.

Introdução

De acordo com o Instituto Nacional do Envelhecimento (1), a esperança média de vida da população tem aumentado significativamente nos últimos cem anos. No entanto, os fenómenos de globalização associados às alterações nutricionais impostas pelas dietas com produtos alimentares transformados fabricados em massa, bem como aos novos hábitos de vida, este aumento não tem sido acompanhado por uma esperança de vida saudável.

Embora tenham aumentado os cuidados de saúde proporcionados pelo desenvolvimento tecnológico nas áreas médica e farmacêutica, alguns hábitos não saudáveis como o estilo de vida sedentário, e as alterações alimentares para dietas de elevado teor calórico e de baixo valor nutricional, são alguns dos fatores de risco que contribuem para o aparecimento de alguns problemas de saúde crónicos.

A par do desenvolvimento tecnológico na área da assistência médica, também a indústria farmacêutica tem vindo a evoluir quer a nível de terapias mais localizadas, quer numa abordagem que envolve sínteses moleculares mais complexas.

A indústria farmacêutica encarregue da investigação, fabrico e comercialização de medicamentos e outros produtos de saúde, tem como objetivo enfrentar e superar muitas das questões relacionadas com a saúde da população. Por conseguinte, em conformidade com a globalização e a esperança média de vida, é incontestável que a indústria farmacêutica tem vindo a evoluir persistentemente ao longo dos anos.

O referido desenvolvimento farmacêutico tem contribuído para o atual desenvolvimento de tecnologias inovadoras.

As preocupações ambientais e legislação em vigor (2) desencadearam a procura por processos industriais de elevada eficiência, com simultânea redução dos compromissos de capital envolvidos, fazendo das tecnologias de membrana, uma das engenharias mais utilizadas na indústria farmacêutica.

Estas tecnologias têm proporcionado um valioso auxílio no desenvolvimento de produtos de vanguarda, e um grande apoio do ponto de vista económico no processo de produção de tais produtos.

Membrane separation technology used in specific pharmaceutical sectors

Membrane separation methodology is a barrier operation where the boundary is a semipermeable membrane that selectively allows some components to cross through the membrane while excluding others upon the action of a driving force.

Additionally, it grants some elements to penetrate more swiftly into the membrane than others, segregating those elements in the fluid (3).

The membrane partition procedure may be set into six different filtration systems, depending on the target goal: microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF), reverse osmosis (RO), pervaporation (PV), and electro dialysis (ED).

In the following work, the main focus will be on the electro dialysis separation technique. Wherein driving force behind the migration of ions across the membrane is a potential difference applied on both sides of the membrane.

The membrane-separation techniques are also widely used in medical devices like haemodialysis (“artificial kidney”), blood oxygenators (“artificial lung”), and other facilities for controlled drug delivery. However, the type of membranes employed in such systems is not under the scope of the present study.

Ionic exchange membranes

The membrane that has gained a prominent place among technological innovations in large-scale chemical processes is the ionic exchange membrane (IEM) (4). These charged membranes are widely used, driving laboratory developments towards improved efficiency, especially nanofiltration and electro dialysis.

Generally, this kind of polymeric membrane is made of highly swellable cohesive gels (e.g., polystyrene) on a polymer backbone to which a charged functional group is attached.

Such polymeric structure is usually made by the polymerisation of functional monomers together with crosslinking agents.

Tecnologias de separação por membrana utilizadas em certos setores farmacêuticos

O método de separação por membranas é uma operação que utiliza uma barreira de separação, nomeadamente uma membrana semipermeável, que mediante a ação de uma força impulsadora, permite a passagem seletiva de alguns componentes, excluindo os outros.

Além disso, este método assegura a passagem mais rápida de determinados elementos relativamente a outros, ajudando assim à segregação desses elementos no fluido original (3).

Dependendo do objetivo, este procedimento de separação pode ser organizado em seis sistemas de filtração diferentes: microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF), osmose inversa (RO), pervaporação (PV), eletrodialise (ED), e separação de gás.

No presente trabalho, o foco principal será a técnica de separação por eletrodialise, na qual a força motriz que impulsiona a migração de iões através da membrana é uma diferença potencial aplicada em ambos os lados da membrana.

Estas técnicas de separação por membrana são também amplamente utilizadas em diversos dispositivos médicos como na hemodiálise (“rim artificial”), oxigenadores de sangue (“pulmão artificial”) e equipamentos para a administração controlada de medicamentos. No entanto, o tipo de membranas utilizados em tais sistemas não serão desenvolvidos no âmbito do presente estudo.

Membranas de permuta iónica

Um tipo de membrana que adquiriu destaque entre as inovações tecnológicas face aos processos químicos conduzidos em grande escala, é a membrana de permuta iónica (MPI) (4). Essas membranas carregadas são atualmente muito utilizadas e têm contribuído para a melhoria de projetos laboratoriais no sentido da sua maior eficiência.

Normalmente, estas membranas são constituídas por géis coesivos altamente expansíveis (p. ex. o poliestireno) sobre uma estrutura de base polimérica, à qual se encontra ligado um grupo funcional carregado.

Este tipo de estrutura é geralmente obtido através da polimerização de monómeros funcionais em conjunto com agentes de reticulação.

Ionic exchange membranes could be divided into four broad categories:

- Perfluorinated ionomers,
- Non-fluorinated hydrocarbons,
- Sulfonated polyarylenes, and
- Acid-base complexes.

These membranes can be labelled homogeneous (5) if the polymer framework already holds the functional sites to sustain the ion-exchange groups. Or else as heterogeneous (5) if charged groups are restrained in limited domains distributed through the membrane matrix.

In this last frame, two different polymers are involved: Beyond the structural matrix polymer, there is another ion-exchange resin, usually finely ground, which is used to carry the functional sites.

Compared to homogeneous IEM, heterogeneous IEM presents improved characteristics, such as higher chemical stability, superior mechanical properties, and relatively low production cost (5).

This type of polymeric structure with a functional group is often exploited as a selective barrier for specific ions and prevents the passage of other ions or molecules. Thus, the ideal IEMs are expected to be highly permselective and hold low electrical resistance (i.e., high conductivity) (5). Both parameters rely on the mobility of ions and other neutral species across membranes.

The ionic conductivity is closely related to the ability of membranes to transport ionic species, and selectivity is the ability of a membrane to separate ions.

Depending on the charge of the functional group in the polymer structure, the membrane may allow a favoured passage of cations or anions.

Therefore, IEM can be referred to as cation-exchange membranes when it carries negatively charged sulfonate groups (SO_3^{2-}) and anion-exchange membranes when its polymer structure supports cationic groups such as quaternary ammonium (NR_4^+).

The polymeric material of the IEMs must satisfy the requirements claimed for the separation ED process, such as:

- Good ionic conductivity,
- Improved chemical and thermal stability,
- Permeability for desired certain species.

As membranas de permuta iónica podem ser divididas de acordo com a sua estrutura polimérica:

- Ionómeros perfluorados,
- Hidrocarbonetos não fluorados,
- Poli-arílenos sulfonados, e
- Complexos de ácido-base.

Estas membranas podem ser definidas como homogéneas (5), se a estrutura polimérica já possuir locais contendo grupos funcionais onde decorrem as trocas iónicas, ou heterogéneas (5), se os grupos carregados estiverem retidos em domínios restritos distribuídos ao longo da matriz da membrana.

Neste último caso, encontram-se envolvidos dois diferentes tipos de polímeros, além do polímero de matriz estrutural, existe ainda outra resina permutadora de iões, que é utilizada para transportar os locais com os grupos funcionais.

Comparativamente à membrana homogénea, a MPI heterogénea apresenta características mais adequadas, tais como uma maior estabilidade química, propriedades mecânicas superiores, e custo de produção relativamente baixo (5).

Este tipo de polímero com um grupo funcional carregado é frequentemente utilizado como barreira seletiva de iões específicos. Deste modo, espera-se que as MPIs ideais sejam altamente permselectivas e com baixa resistência elétrica (i.e., elevada condutividade) (5). Ambos os parâmetros são estabelecidos pela mobilidade iónica e molecular ao atravessar as membranas.

A condutividade iónica está diretamente relacionada com a capacidade de transporte de espécies iónicas por parte das membranas, e a seletividade com a capacidade em separar iões.

Dependendo da carga do grupo funcional existente na estrutura da membrana utilizada, esta pode permitir a passagem preferencial de catiões ou aniões.

Assim, a MPI pode ser referida como membrana de troca catiónica quando contem grupos sulfonados de carga negativa (SO_3^{2-}), e de troca aniónica quando a sua estrutura polimérica suporta grupos catiónicos como é o caso das aminas quaternárias (NR_4^+).

O material das MPIs deve satisfazer os requisitos exigidos para o processo de separação eletrodialítica (ED), i.e., possuir:

- Boa condutividade iónica,
- Elevada estabilidade química e térmica,
- Permeabilidade para as espécies desejadas.

The role of the cationic exchange membrane (CEM) is to be selectively permeable to cations, preferably protons moving from the anode to the cathode. As most popular, the Nafion® N-117 membrane (DuPont, Wilmington, DE, USA) is a widely used CEM due to its high specificity toward protons and other small cations (6).

Nevertheless, this membrane material has limitations, including its weak mechanical strength and high cost, making it unsuitable for long-term studies. Therefore, its replacement with more resistant polymer materials and more moderate production cost is highly desirable.

Similarly, the anion-exchange membrane (AEM) is rather selective for the passage of anions, albeit from both compartments.

In addition, the alkaline environment enclosing AEM allows the selection of non-precious metals as the catalyst material for the evolution of hydrogen and oxygen during its use in water electrolysis.

In accordance, AEM is often used to produce green hydrogen by water electrolysis (7).

This kind of IEM is an essential component in microbial desalination systems, allowing the preferential passage of anions.

In ED, the ionic conductivity (8) characterises the ion transport rate and determines the ohmic losses in membranes during separation electro dialysis processes.

The permselectivity and conductivity of the membranes are, to some extent, in contrast to each other since the growth in moisture content of membranes resulting from their use in liquid separation promotes a simultaneous rise in conductivity and a decrease in the selectivity of transport processes.

Polymeric membranes must satisfy several criteria to intensify ED efficiency:

- High ionic conductivity to provide high currents with minimal resistive losses;
- Minimal or no electronic conductivity;
- Good mechanical strength and stability;
- Chemical and electrochemical stability under operating conditions;

A utilidade da membrana de permuta catiónica (MPC) é ser seletivamente permeável aos catiões, de preferência protões, que se deslocam do ânodo para o cátodo. Sendo a membrana Nafion® N-117 (DuPont, Wilmington, DE, EUA) a MPC mais popular frequente e largamente utilizada, devido à sua elevada especificidade em relação aos protões e outros pequenos catiões (6).

Contudo, esta membrana apresenta algumas limitações, como a sua fraca resistência mecânica e o seu elevado custo, tornando-a menos acessível para estudos de longa duração. Assim, a sua substituição por materiais mais resistentes e com custo de produção mais moderados é altamente desejável.

Do mesmo modo, a membrana de permuta de aniónica (MPA) é bastante seletiva para a passagem de aniões de qualquer um dos compartimentos.

Além disso, o ambiente alcalino que envolve a MPA permite a utilização de metais não preciosos como catalisadores para a evolução do hidrogénio e oxigénio durante a sua utilização no processo de eletrólise da água.

Sendo a MPA é frequentemente usada na produção de hidrogénio-verde por eletrólise da água (7).

Este tipo de MPI é um componente importante nos sistemas microbianos de dessalinização, permitindo a passagem preferencial de espécies aniónicas.

Nos processos de separação por eletrodialise, a condutividade iónica (8) caracteriza a intensidade do transporte iónico e determina as perdas óhmicas das membranas.

A permeabilidade seletiva e a condutividade das membranas encontram-se em posições contrárias, uma vez que o aumento do teor de humidade na estrutura das membranas, resultante da sua utilização durante a separação de líquidos, promove um aumento da condutividade, mas contribui simultaneamente para a diminuição da seletividade nos processos de transporte.

A eficiência de separação iónica pelas células de ED é elevada quando a membrana satisfaz os critérios:

- Condutividade iónica elevada, com vista a prover correntes elevadas e perdas resistivas mínimas;
- Condutividade eléctrica mínima ou inexistente;
- Boa resistência mecânica e estabilidade;
- Estabilidade química e eletroquímica nas condições de funcionamento;
- Nível de humidade adequada;

- Adequate moisture level;
- Extremely low fuel or oxidant permeability to maximise the Faraday efficiency of the electrochemical process (aka Coulomb or current efficiency);
- Cost-effectiveness.

From a competitive perspective, it is also necessary to ensure the membranes' properties employed during the pharmaceutical industry's separation methods to satisfy the low internal resistance, good separation, and adequate physical strength.

High-performance, low-cost commercial ionic exchange membranes

In the scope of another sector, the transport properties of two ionic exchange membranes were analysed in a study by Morais et al. (9)

Effectively, two commercially available ion-exchange membranes were investigated as laboratory-assembled fuel cells separators in the scope of the energy supply/source context: the cationic exchange membrane CMI-7000S and the anionic exchange membrane, AMI-7001S (both Membranes International Inc., Ringwood, NJ, USA).

Some electrochemical parameters were also collected.

In this work (9), the operation of IEMs as electrochemical cell separators were assessed by analysing the performance of laboratory-made fuel cells (Pt, NaBH₄/commercial membrane separator/H₂O₂ + Pt).

Therefore, the anion- and cation-exchange membranes' performance was appraised by recording the electrochemical parameters in a PAR 273A potentiostat/galvanostat during the fuel cells' performance. Specifically, the fuel cell:

- Polarisation;
- Power density;
- Stability.

For a more comprehensive evaluation of the studied membranes, the collected data were then used to determine some other essential electrochemical parameters like the energy densities and specific capacities of the electrochemical system of the fuel cell.

- Baixa permeabilidade de espécies indesejáveis, de modo a maximizar a eficiência de Faraday do processo eletroquímico (eficiência de coulomb ou da corrente);
- Boa relação custo-eficiência.

Do ponto de vista industrial, é assim necessário chegar a um compromisso entre as características existentes, de modo a fazer cumprir os requisitos de baixa resistência interna, boa separação de espécies, bem como uma adequada resistência física das membranas utilizadas nos processos de separação industriais.

Membranas de permuta iônica comerciais, com elevada eficiência, a baixo custo

No âmbito de um outro sector e sob a pesquisa de Morais et al. (9), foram recolhidos alguns dados sobre as propriedades de transporte de duas membranas de permuta iônica.

Nesse trabalho foram investigadas duas membranas de troca iônica comercialmente disponíveis, usadas como separadores nas células de combustível no âmbito do fornecimento de energia: a membrana de troca catiónica CMI-7000S e a membrana de troca aniónica, AMI-7001S da Membranes International Inc., Ringwood, NJ, EUA.

De modo complementar foram recolhidos alguns parâmetros eletroquímicos importantes.

No trabalho de Morais et al., o desempenho das MPIs como separadores de células eletroquímicas foi avaliado através da análise do desempenho da célula de combustível preparada em laboratório (Pt, NaBH₄/separador de membrana comercial/H₂O₂ + Pt).

Com efeito, o funcionamento das membranas de permuta aniónica e catiónica foi avaliado através do registo de alguns parâmetros eletroquímicos pelo potenciostato/galvanostato PAR 273A, durante o funcionamento da célula de combustível, em particular a sua:

- Polarização;
- Densidade de potência alcançada;
- Estabilidade.

Tendo como objetivo uma avaliação mais abrangente das membranas analisadas, os dados recolhidos foram utilizados na determinação de outros parâmetros da célula, tais como as densidades energéticas e as capacidades específicas do sistema eletroquímico.

The evaluation of IEMs as separators of an electrochemical system (9) was made at room temperature. The membranes used to separate the acidic and alkaline chambers (the anolyte/ the catholyte compartments each of 75 cm³) hold an active area of ca. 30 cm².

For the electrochemical parameter evaluation, a Pt electrode was used as both anode and cathode, and a saturated calomel reference electrode (SCE) to measure the anode/cathode overpotentials during the cell discharge.

Electrolytes

In the Morais *et al.* experiments (9), the assembled fuel cell (drawn in Figure 1) had highly opposing pH electrolyte solutions, making them very reactive, so the separating membranes must ensure their segregation. The anolyte solution consisted of 1 M NaBH₄ with 4 M NaOH (highly alkaline solution) and the catholyte on 3 M H₂O₂ with 1 M HCl (considerably acid mixture).

A avaliação das MPIs como separadores do sistema eletroquímico (9) foi realizada à temperatura ambiente, usando uma membrana com uma área ativa de cerca de 30 cm² a separar os compartimentos das soluções ácida e alcalina (anólito/católito) de 75 cm³.

Para a avaliação dos parâmetros eletroquímicos, foram selecionados os elétrodos de Pt como ânodo e cátodo, e um elétrodo de referência de calomelano saturado (SCE) para medir o sobrepotencial do ânodo/cátodo durante a descarga da célula.

Soluções eletrolíticas

Nas experiências de Morais *et al.* (9), foi montada uma célula de combustível (representada na Figura 1) usando soluções eletrolíticas de pHs distintos, tornando-as muito reativas, pelo que as membranas deverão garantir o seu eficiente confinamento. Com efeito, a solução de anólito constou de 1 M NaBH₄ com 4 M NaOH (solução altamente alcalina), e o católito na solução de 3 M H₂O₂ com 1 M HCl (mistura bastante ácida).

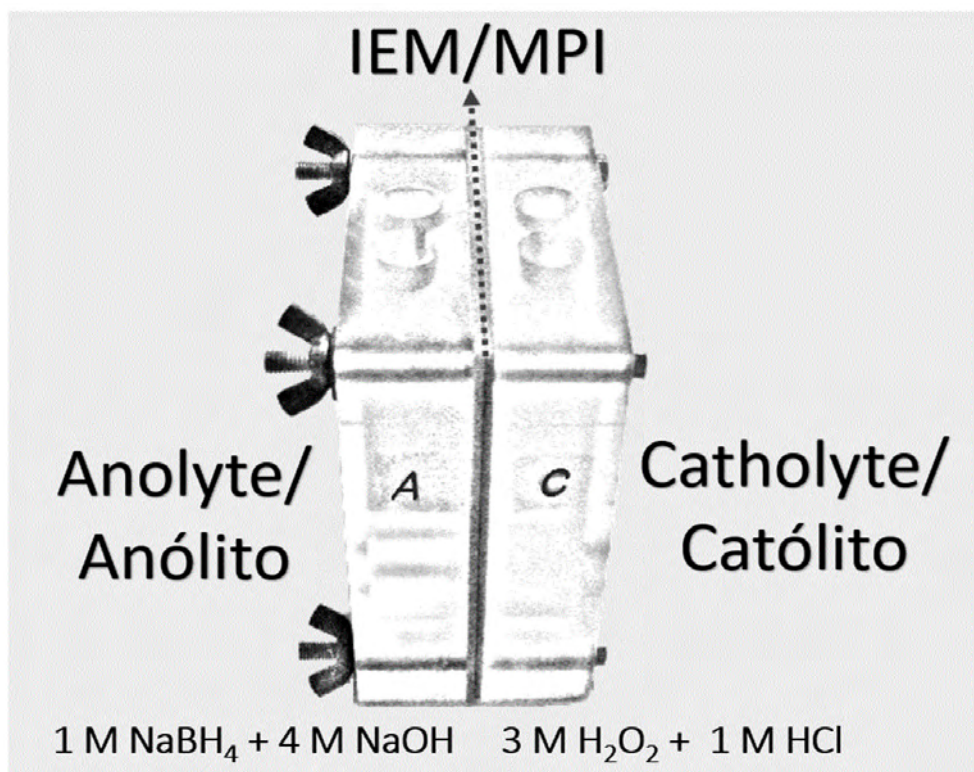


Figure 1 - Drawing of the fuel cell assembled in the laboratory (9).

Figura 1 - Esquema da célula de combustível montada em laboratório (9).

Pre-treatment of polymeric membranes

Both polymeric membranes were activated by a pre-treated through dipping into deionised water for 24 h with water being changed twice during that period, followed by immersion in a solution of NaOH (4 M) for two hours.

Membranes' characterisation

The morphology of the surface and cross-section of the membranes were analysed by field-emission gun scanning electron microscopy and revealed that both surfaces presented a certain degree of roughness, and their topography was clean of foreign material.

The cross-section observations revealed the presence of densely packed microfiber within the structure of both membranes, with the anionic membrane (AMI-7001S) showing additional filaments among the microfibers.

Working principle of IEMs in the ED separation process

Electrodialysis is one of the most used electrically driven membrane separation processes among industrial synthesis (10). It involves an electrochemical membrane process, which conveys the pertinent ions through perm-selective membranes under the effect of a direct electric current field (drawn in Figure 2).

Three types of selective membranes may assist the electro-dialytic separation process: cation-exchange, anion-exchange, and bipolar membranes.

Ionic exchange membranes operate according to the principle of Donnan exclusion (11), i.e., only allowing the transference of oppositely charged ions. Conversely, the transfer of ions of the same charge as the immobilised ionic group at the membranes' surface is mostly blocked (Figure 2).

The ions that compose an aqueous solution may be carried across the boundary layer (12) of an ionic exchange membrane under three routes of mass transport: diffusion, migration, or convection.

Pré-tratamento das membranas poliméricas

Ambas as membranas foram ativadas mediante um pré-tratamento por imersão em água desionizada durante 24 h, tendo esta água sido mudada duas vezes durante esse período, seguido de imersão numa solução 4 M NaOH, durante duas horas.

Caracterização de membranas

A morfologia da superfície e a secção transversal das membranas foram analisadas através da microscopia eletrónica de varrimento de emissão de campo, revelando que ambas as superfícies apresentavam um certo grau de rugosidade e a sua topografia se encontrava limpa de qualquer material estranho.

A observação da secção transversal revelou a presença de microfibras densamente compactadas dentro da estrutura de ambas as membranas, com a membrana aniónica (AMI-7001S) a exibir filamentos adicionais entre as microfibras.

Princípio de funcionamento das MPIs no processo de separação por ED

A eletrodialise é um das técnicas, eletricamente orientada, mais utilizadas para a separação em processos de síntese industrial (10). Esta envolve um processo eletroquímico de separação por membrana, no qual são transportados os iões pertinentes através de uma membrana permselectiva quando se encontra sob o efeito de um campo corrente eléctrica direto (Figura 2).

Existem três tipos de membranas seletivas que podem auxiliar no processo de separação eletrodialítica: as membranas de permuta catiónica, de permuta aniónica e bipolares.

As membranas de troca iónica funcionam de acordo com o princípio de exclusão de Donnan (11), o qual estabelece apenas a passagem de iões com carga contrária. Sendo, a transferência de iões com carga igual à do grupo iónico imobilizado à superfície das membranas, na sua maioria bloqueada (Figura 2).

Com efeito, os iões que compõem uma solução aquosa podem ser transportados através da camada limite da membrana (12) de permuta iónica sob três modos de transporte de massa: por difusão, migração ou convecção.

Nevertheless, when a bulk solution is under unforced flow, gravitational or electroconvection forces provide the ions from the bulk solution towards the surface of the IEM through a boundary layer there formed (12).

When the boundary layer is formed on an AEM, convection converts to migration and diffusion and is responsible for the electric current transport. When it is over a CEM, the convection only converts to migration and carries an electric current (12).

While the anodic and cathodic reactions occur in each EC cell chamber, the electric field is build-up, thereby gathering the resulting ions at the surface of the ion-exchange membrane used as a separator. Such a situation fosters the ions' transference by migration.

Therefore, it is possible to conclude that migration is the main mass transport approach for the ions to be segregated under an ED system.

Numa solução de caudal não forçado, são as forças gravitacionais ou de electroconvecção que impelem os iões do interior da solução em direção à superfície da membrana através da camada limite formada nessa superfície (12).

Quando a camada limite é formada sobre uma membrana de permuta aniónica, a convecção converte-se em migração e difusão e transporta uma corrente elétrica. Quando esta é formada sobre uma membrana de permuta catiónica, a convecção converte-se somente em migração e é igualmente responsável pelo transporte da corrente elétrica (12).

À medida que as reações anódicas e catódicas ocorrem em cada um dos compartimentos da célula eletroquímica, o campo elétrico vai aumentando e deste modo acumulando os iões resultantes na superfície da membrana de troca iónica usada como separador. Tal situação fomenta a transferência de iões por migração.

Assim, é possível concluir que a migração constitui a principal abordagem de transporte em massa dos iões a serem segregados num sistema ED.

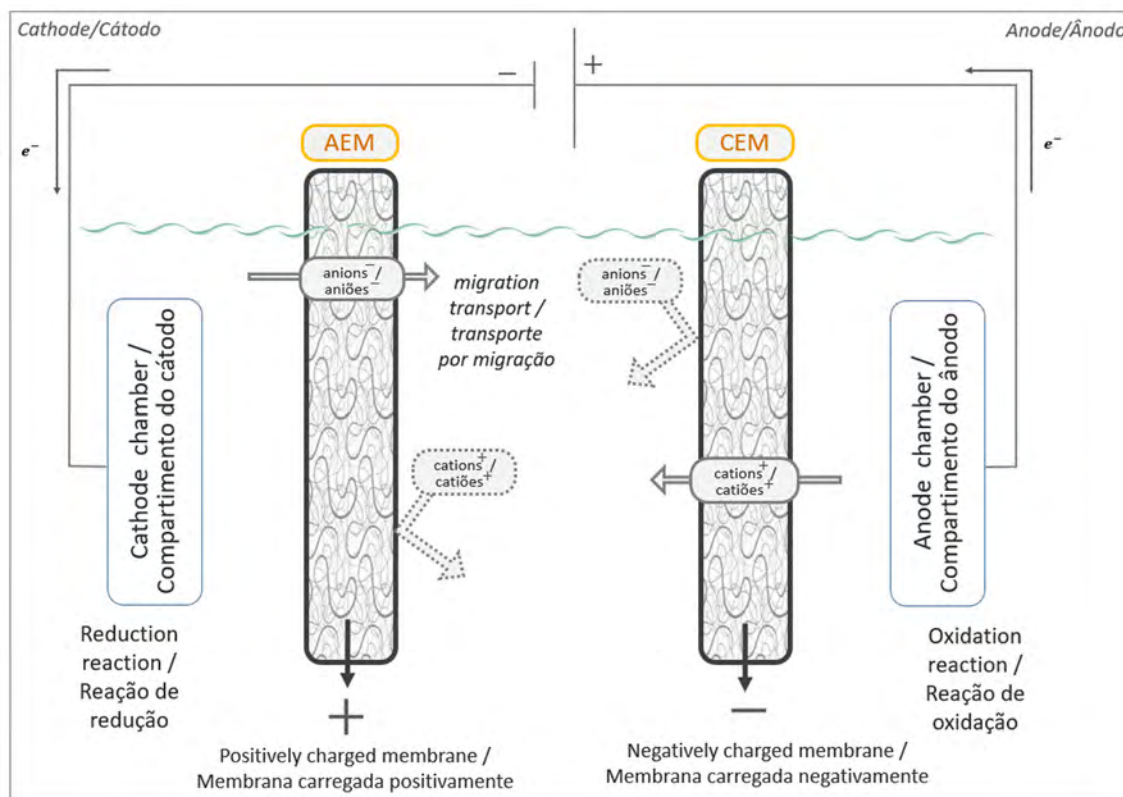


Figure 2 - Schematic diagram of the significant migrative fluxes crossing an anion (AEM) and a cation (CEM) exchange membrane when under an electrochemical system (11).

Figura 2 - Diagrama esquemático dos fluxos migratórios significativos que atravessam uma membrana de troca aniónica (AEM) e catiónica (CEM), quando sob um sistema eletrodialítico (11).

Nevertheless, some diffusional crossover of neutral species through a membrane occurs to a certain extent (especially through the AEM) and occurs due to the concentration gradient between the anode and the cathode compartments.

The CEM is embedded with functional groups (FGs) of negative charge; therefore, it essentially attracts positive charges, and the other way around occurs in the AEM. Especially in strong acid cationic exchange membrane (as CMI-7000S with HSO_3 as FG), the repulsive force between the ion-exchange functional groups (SO_3^-) and the co-ions (OH^- , ions with the same charge as the functional group of IEM) is relatively high.

In this case, the water dissociation reaction is restrained, and the charge balance is made by ionic migration through the polymeric membrane (12).

Some point after the ionic transference, the concentration gradient becomes relatively high; therefore, the diffusion crossover of some neutral species like the NaOH, HCl, or organic compounds also takes place to a certain extent, aiming the system to reach an equilibrium state.

Conversely, in the strong base anionic exchange membrane (AMI-7001S with quaternary ammonium as FG), the repulsive forces between those ion-exchange group species ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_4$) and the co-ions (H^+) are relatively low. As a result, the water molecular dissociation is not suppressed.

In the case of the analysed electrochemical fuel cell system (9), where a highly strong acid and base were used as electrolytes, the charge transfer relied on the type of membrane used as a separator:

1. In the case of AMI-7001S, OH^- and Cl^- anions migrate from the cathodic to the anodic compartment to keep the cell charge balance;
2. Conversely, Na^+ cations cross through the CMI-7000S in the cathode direction, keeping the charge balance (almost no H^+ in the solution because the dissociation of H_2O_2 is inhibited).

Although AMI-7001S and CMI-7000S are charge selective membranes, which allow the preferential passage of oppositely charged species, there is a limit to an ion migration toward the oppositely charged compartment whenever both IEMs are used as separators (dashed arrows depicted in Figure 2).

No entanto, ocorre até certo, algum cruzamento difusional de espécies neutras através de uma membrana (através da membrana de permuta dos aniões) sobretudo devido ao gradiente de concentração que se forma entre os compartimentos anódico e catódico.

A MPC, que apresenta grupos funcionais (FGs) de carga negativa, atrai essencialmente espécies de carga positiva, o contrário relativamente ao que ocorre com a MPA. Particularmente na MPC, cujo grupo funcional é um ácido forte (como é o caso de CMI-7000S), a força repulsiva entre os grupos funcionais de permuta iônica (SO_3^-) e os co-íões existentes em solução (OH^- , íões com a mesma carga que o grupo funcional da MPI) é bastante elevada.

Neste caso, a reação de dissociação da água encontra-se restringida e o balanço da carga é feito pela migração iônica que ocorre através da membrana polimérica (12).

Após a transferência iônica, o gradiente de concentração torna-se bastante elevado e, por conseguinte, o transporte por difusão de algumas espécies neutras, como é o caso de NaOH, HCl ou outros compostos orgânicos, irão também ocorrer, visando assim alcançar o estado de equilíbrio do sistema.

De modo recíproco na membrana de permuta aniônica, cujo FG é uma base forte (AMI-7001S com uma amina quaternária como FG), as forças repulsivas entre essas espécies ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_4$) e os co-íões (H^+) em solução, são relativamente baixas e deste modo a dissociação da água já não é suprimida, podendo ocorrer mais facilmente.

No caso do sistema eletroquímico de células combustíveis (9), onde um ácido e uma base extremamente fortes foram utilizados como eletrólitos, a transferência de carga baseou-se no tipo de membrana utilizada como separador:

1. No caso de AMI-7001S, os aniões OH^- e Cl^- migram do compartimento catódico para o anódico de modo manter o equilíbrio da carga celular;
2. De modo inverso, os catiões Na^+ atravessam o CMI-7000S no sentido catódico, mantendo o equilíbrio da carga (no entanto neste caso dada a inibição da dissociação da molécula de H_2O_2 quase não há H^+ em solução).

Embora AMI-7001S e CMI-7000S sejam membranas seletivas de carga que permitem a passagem preferencial de espécies com carga oposta, existe um limite quanto à migração de íões para o compartimento de carga oposta, sempre que são utilizadas ambas as MPIs como separadores (setas tracejadas representadas na Figura 2).

Table 1 - Main properties of the two studied membrane separators investigated by Morais et al. (9).
Tabela 1 - Principais propriedades das duas membranas de separação analisadas por Morais et al. (9).

	AMX	CMX
Membrane type / Tipo de membrana	Homogeneous strong base anion exchange membrane / Membrana heterogénea de troca aniónica de base forte	Homogeneous strong acid cation exchange membrane / Membrana heterogénea de troca catiónica de ácidos fortes
Functional group / Grupos funcionais	Quaternary ammonium / Amina quaternária	Sulfonic acid/ Ácido sulfónico
Thickness / Espessura (mm)	0.17	0.14
Electrical resistance in 0.5 M NaCl / Resistência elétrica ($\Omega \text{ cm}^2$)	2.4	3.0
Permselectivity / Permselectividade (0.1 mol KCl kg^{-1} / 0.5 mol KCl kg^{-1})	98 ^a	98 ^a
Ion exchange capacity / Capacidade de troca iónica (meq.g^{-1})	1.4-1.7	1.5-1.8
Mullen burst strength test / Teste de resistência à rutura de Mullen (MPa)	≥ 0.25	≥ 0.40
Thermal stability / Estabilidade térmica ($^{\circ}\text{C}$)	40	

Thickness

In Morais et al. study (9), the higher power density of the thinner 0.18 mm thick Nafion® N-117 membrane was prominent, compared to the 0.45 mm AMI-7001S and CMI-7000S analysed membranes.

The membranes thickness strongly influences the membrane's electro dialysis separation process.

Accordingly, a higher thick polymer membrane grants a greater strength and endurance on its usage during the separation process, and it further reduces the unwanted reactants to crossover.

Furthermore, thicker membranes also have a more extended pathway for ion transport during the electro dialysis; therefore, they show a higher ionic resistance.

Conversely, the peak power density of an electrochemical system increases inversely with the thickness of the membrane used to split the electrochemical cell. It occurs because ions must cross a higher average free path between the anodic and cathodic compartments.

Thus, the thickness of the polymeric membrane has a significant impact on the performance of the electro dialysis separation cell.

Espessura da membrana

No estudo Morais et al. (9), destacou-se a maior densidade de potência na membrana mais fina Nafion® N-117, 0,18 mm de espessura, em comparação com as membranas 0,45 mm AMI-7001S e CMI-7000S analisadas.

A espessura das membranas tem uma forte influência no processo de separação por eletrodialise da membrana.

Consequentemente, uma membrana polimérica de maior espessura confere uma maior resiliência e durabilidade durante o processo de separação e reduz a passagem de reagentes indesejados pela membrana.

Por outro lado, as membranas mais espessas têm também uma via mais longa para o transporte de iões durante a eletrodialise, apresentando assim uma maior resistência iónica.

Em contrapartida, o valor máximo da densidade de potência de um sistema eletroquímico aumenta de forma inversa relativamente à espessura da membrana utilizada na divisão da célula eletroquímica. Esta situação ocorre porque os iões necessitam percorrer uma distância média mais elevada durante a passagem entre os compartimentos anódico e catódico.

Assim, a espessura da membrana polimérica tem um impacto significativo no desempenho da célula de separação por eletrodialise

Results

In the energy-supply research scope, the fuel cell electrode potentials recorded in Morais et al. (9) show an excellent behaviour of both EMIs employed. Nevertheless, energy supply approach, the CMI-7000S membrane exhibits a better power cell performance than the AMI-7001S. This result highlights the higher ohmic resistance of the AMI-7001S reported in Table 1.

Such improved behaviour of CMI-7000S membrane is reflected in other analysed parameters.

As the current density showed a slower decay over time and fuel cell potentials with longer-term durability, which is verified by:

From laboratory-made electrochemical cells performances, it was prominent that the current density relies on pH fluctuation on each of the cell compartments,

The faster decay observed in fuel cell voltage with the AMI-7001S as separator results from the higher decline in the cathodic electrical potential,

Usually, the ion-exchange membranes are sensitive to OH radicals produced during H_2O_2 catalytic decomposition, with membranes durability constrained by those radicals.

After repeated electrochemical tests, no fouling or physical degradation of the two investigated MPIs was found.

Therefore, it is worth noting that no physical/mechanical degradation of the two membranes was visible during and after extensive use.

Pharmaceutical sectors

Pharmaceutics (13) are a milestone in human scientific development, as they have enabled the cure of millions of deadly diseases, improved the quality of life, and prolonged the population's life span.

Those pharmaceuticals include a massive group of chemical compounds that bind to specified human and animal receptors, aiming for a particular therapeutic activity (through various mechanisms of action) in a given target organism. These specific mechanisms of

Resultados

No âmbito da investigação sobre o fornecimento de energia, os potenciais de eléctrodo da célula de combustível registados no trabalho de Morais et al. (9) mostraram um excelente comportamento para ambas as MPI analisadas. Contudo, a membrana CMI-7000S usada como separador, conduz a um melhor desempenho da célula de combustível do que a AMI-7001S. Este resultado realça a maior resistência óhmica da membrana AMI-7001S mencionada na Tabela 1.

Esta melhor performance da membrana CMI-7000S reflete-se noutros parâmetros electroquímicos analisados.

Como é o caso da densidade de corrente que apresenta uma queda mais lenta ao longo do tempo e maior durabilidade, a longo prazo, dos potenciais da célula de combustível:

A partir do desempenho das células electroquímicas feitas em laboratório, foi evidente que a densidade da corrente depende da flutuação do pH em cada um dos compartimentos da célula,

A tensão da célula de combustível apresenta um declínio mais rápido quando a membrana AMI-7001S é usada como separador, resultando numa maior diminuição no potencial eléctrico catódico,

Normalmente, as membranas de troca iónica são sensíveis aos radicais OH produzidos durante a decomposição catalítica de H_2O_2 , sendo a durabilidade destas restringida por esses radicais.

Após vários ensaios electroquímicos, não foi verificada qualquer incrustação ou degradação física das duas MPIs investigadas.

Por conseguinte, vale a pena mencionar que nenhuma degradação física/mecânica das duas membranas foi observada durante e após utilização extensiva destas.

Sector farmacêutico

Os produtos farmacêuticos (13) são um marco no desenvolvimento científico humano, pois permitem o tratamento de milhões de doenças potencialmente fatais, melhoram a qualidade de vida e prolongam a esperança de vida da população.

Estes produtos incluem um grupo considerável de compostos químicos que se ligam a determinados recetores humanos e de animais, visando uma atividade terapêutica específica num órgão-alvo. Esta atividade terapêutica ocorre através de vários mecanismos de

action can also affect both prokaryotic and eukaryotic cells of organisms found in the environment (13).

The biological stability and resistance to biodegradation of medicines increase their performance in the prokaryotic aquatic environment by increasing their half-life in the body. Such a situation makes these chemical compounds environmentally persistent.

The environmental persistence of pharmaceuticals and their bioaccumulation promotes the increase of possible toxic and carcinogenic effects on organisms (animals, flora, and fauna).

In addition to human medication, there is also medication for veterinary therapy and enhancement of animal reproductive systems, which use various hormonal compounds and antibiotics.

Therefore, pharmaceuticals have emerged as a new class of environmental contaminants in recent decades, with pharmacologically active compounds exerting toxic effects on numerous organisms whenever by-products of the pharmaceutical industry are disposed of in the environment.

To sustain the development and improvement of chemical and biochemical industries of the pharmaceutical sector, the production of some compounds with diverse bioactivities (antimicrobial, antibacterial and antifungal) claims the implementation of innovative methods for their production.

Regarding the procedure adopted by many industrial chemical syntheses, extraction and the treatment of the resulting fermentation broth are required (14).

In fact, many pharmaceutical formulations make use of fermentation techniques during the development of their active ingredients. In principle, all fermentation processes of the pharmaceutical industry take advantage of membrane separation technology.

Such is the case for carboxylic acids (15) and several organic acids (16) that need to be extracted from their broth to proceed to their crystallisation after the fermentation process. These extraction steps use the benefits of the electro dialysis system, among others.

ação, específicos que podem igualmente afetar as células eucarióticas e procarióticas de alguns organismos encontrados no meio ambiente (13).

A estabilidade biológica e a resistência à biodegradação dos medicamentos aumentam os benefícios desses fármacos no ambiente procariótico, aumentando o seu tempo de meia vida no organismo e tornando estes compostos químicos ambientalmente persistentes.

Esta persistência ambiental dos produtos farmacêuticos e a sua bioacumulação promove o aumento de possíveis efeitos tóxicos e cancerígenos sobre outros organismos (animais, flora e fauna).

De modo complementar à medicação humana, existe ainda a medicação aplicada à terapia veterinária e ao aperfeiçoamento dos sistemas reprodutivos animais, os quais utilizam vários compostos hormonais e antibióticos.

Deste modo, nas últimas décadas, os produtos farmacêuticos tornaram-se uma nova classe de contaminantes ambientais, com os compostos farmacologicamente ativos a exercerem efeitos tóxicos sobre inúmeros organismos sempre que os subprodutos da indústria farmacêutica são descartados no ambiente.

Para assegurar o desenvolvimento e progresso nas indústrias químicas e bioquímicas do sector farmacêutico, a produção de alguns compostos com recurso a diversas bioatividades (antimicrobianas, antibacterianas e antifúngicas) exige a implementação de métodos inovadores na sua preparação.

No que diz respeito ao procedimento adotado por muitas indústrias de sínteses químicas, são necessários os procedimentos da extração bem como o tratamento do meio de cultura resultante (14).

De facto, muitas formulações farmacêuticas fazem uso de técnicas de fermentação durante o desenvolvimento dos seus princípios ativos. E de um modo geral, todos os processos de fermentação da indústria farmacêutica tiram partido da tecnologia de separação por membranas.

Tal é o caso dos ácidos carboxílicos (15) e de vários ácidos orgânicos (16) que necessitam ser extraídos do seu meio de fermentação para procederem à sua posterior cristalização. Estas etapas de extração fazem uso dos benefícios do sistema de eletrodialise, entre outros.

Given that more than 95% of pharmaceutical manufacturing concerns liquid partitioning, the most widely used separation procedure within the industrial processes embraces the concentration and purification of pharmaceutical products.

In light of this, membrane separation technology has been predominantly employed for (3) chemical separation, improvement of synthesis processes, wastewater purification, and waste/solvent recovery (Figure 3).

IEM may drive laboratory developments towards their improved efficiency, including medicine production

The isolation and purification steps of medicines adopt membrane separation technology, in which various purification methods refine their respective fermentation broths.

Namely, the membrane separation process is widely used in antibiotics industrial-scale production, where various fungi and bacteria foster the development of active antimicrobial substances of such drugs. (13, 17).

Uma vez que mais de 95% da produção farmacêutica envolve a separação de líquidos, o procedimento de separação mais utilizado no âmbito dos processos industriais farmacêuticos, engloba a concentração e a purificação de produtos finais.

Perante esta situação, a tecnologia de separação por membrana tem sido utilizada para (3) a eficiente separação química, melhoria dos processos de síntese, purificação de águas residuais e recuperação de resíduos/solventes (Figura 3).

A MPI pode impulsionar os desenvolvimentos laboratoriais para a sua maior rentabilidade, tal como na produção de fármacos

A tecnologia de separação por membrana é adotada durante as fases de isolamento e purificação dos medicamentos, em que vários métodos de refinamento aperfeiçoam o seu meio de fermentação.

Nomeadamente, o processo de separação de membranas, amplamente utilizado na produção de antibióticos à escala industrial, no qual fazem uso de diversos fungos e bactérias para promover o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas ativas (13, 17).



Figure 3 - Pharmaceutical industry' electro dialysis processes in which IEM are generally used.

Figura 3 - Processos de eletrodialise da indústria farmacêutica nos quais as MPI são geralmente utilizadas.

Ionic exchange membranes are suitable for a single membrane and bipolar membrane electro dialysis (BM ED) processes, which have been developed to convert salts into corresponding acids and bases.

Consequently, ED processes have also been found to be suitable and cost-effective for the recovery of organic acids or amino acids from their respective salt (18).

Bipolar membranes (BMs) comprise a unique form of ion-exchange membranes established by a cationic and anionic exchange layer, which allows the production of protons and hydroxide ions through the dissociation of the water molecule.

In addition, the electro-hydrolysis of water, which produces H^+ and OH^- ions, may also be exploited to transport components used to produce organic acids such as particular daily vitamin supplements, which leads to economic and environmental benefits (19, 20).

According to the specific requirements and the ED process steps, the ED technique uses several separating membrane models in some membrane separation processes. For instance, AEM served as a barrier in the three-compartment configuration of (Anode-AEM1-Membrane Ultra-Filtration-AEM2-Cathode) ED with ultrafiltration membrane (ED/UF) system (21), for the separation of chitosan oligomer under applied electric field strength.

Chitosan is a natural co-polymer with a considerable biomedical value since it possesses anti-tumour and antimicrobial activities widely used to resolve some osteoarthritis– gastritis health problems (22).

An effective oligomer separation (dimer from the trimer and tetramer) was achieved by ultrafiltration membrane area under applied electric field strength of 2.5 V/cm.

Carboxylic acids functional group adjusts drug bioavailability

Drug absorption (23) relies on drug hydrophilic/hydrophobic balance value, which depends upon polarity and ionization.

Highly polar or strongly ionized drugs cannot efficiently cross the cell membranes of the gastrointestinal barrier. An intravenous route should therefore be followed for

As membranas de permuta iónica são adequadas para uma configuração de eletrodialise (ED) de membrana única, bem como para processos de eletrodialise de membrana bipolar (BM-ED), os quais foram desenvolvidos para a conversão de sais nos seus correspondentes ácidos e bases.

Por conseguinte, os processos de ED foram igualmente considerados adequados e rentáveis para a recuperação de ácidos orgânicos ou aminoácidos dos seus respetivos sais (18).

As membranas bipolares (BMs) compreendem uma forma única de membranas de intercâmbio iónico, estabelecido por uma camada de troca catiónica e aniónica, que permite a produção de protões e iões hidróxido, mediante a dissociação da molécula da água.

Tal eletrólise da água, pode igualmente ser explorada para o transporte de componentes que são utilizados na produção de ácidos orgânicos, tais como certos suplementos vitamínicos de uso quotidiano, conduzindo assim a benefícios económicos e ambientais (19, 20).

Por vezes os processos de separação ED utilizados na indústria química requerem a utilização de vários tipos de membrana, de acordo com as etapas da separação e o objetivo da ED. Como exemplo, temos a configuração ED que fez uso de duas MPAs como barreira na célula de três compartimentos de (Ânodo-MPA1-Membrana de ultrafiltração-MPA2-Cátodo), juntamente com sistema de membrana de ultrafiltração (ED/UF) (21), para a separação do oligómero quitosano, quando submetido à força de um campo elétrico aplicado.

O quitosano é um co-polímero natural com um valor biomédico considerável, uma vez que possui atividades antitumorais e antimicrobianas amplamente utilizadas no tratamento de alguns problemas de saúde como a osteoartrose ou gastrite (22).

Com efeito, foi assegurada a separação eficaz do oligómero (dímero do trímero e do tetrâmero) ao usar um tipo de membrana de ultrafiltração sob o efeito de força de campo elétrico aplicado de 2,5 V/cm.

O grupo funcional do ácido carboxílico reajusta a biodisponibilidade dos fármacos

A absorção dos fármacos (23) depende do equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico dos compostos químicos que o compõem, o qual por sua vez depende da sua polaridade e grau de ionização.

Os fármacos altamente polares ou fortemente ionizáveis, não podem atravessar eficazmente as

taking these types of drugs. Nevertheless, the associated disadvantage is their prompt elimination from the organism.

On the other hand, non-polar drugs are poorly soluble in aqueous media and hence poorly absorbed through cell membranes. If taken intravenous, they will most probably be retained within fat tissues.

In order to overcome this problem, the drug polarity and/or ionization must be altered by changing its substituents.

One way of suppressing this is to alter drug pKa with the addition of a carboxylic acid that may withdraw electrons from the drug ring structure (24).

Carboxylic acids are the most common organic acids large scale used in pharmaceutical drugs (25), chemical (26) and food industry (27). Namely in the production of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), in coatings and polymer industry as solvents, or still as food additives as antimicrobial and flavouring agents.

The carboxylic acids most widely found among pharmaceuticals are :

- 2-aryl-propionic acid, a propionic acid derivative as one of the most widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs class (NSAIDs).
- Citric acid is commonly used as a preservative excipient in pharmaceutical preparations to preserve their drug active substance stability due to its antioxidant properties.
- 4-Toluenesulfonic acid as counter-ions during the synthesis of the alkaline drug, given the combination of its hydrophilic nature and high acidic properties.
- Salicylic acid is the raw material of aspirin production and skin formulations since it facilitates the outer layer of skin removal.
- Itaconic acid has a renewable dicarboxylic structure used in the preparation of biocompatible hydrogels essential for the controlled release of some drugs within the organism.
- Ascorbic acid is widely used as an antioxidant agent in preventing and treating several oxidative damages to the human organism.

membranas celulares da barreira gastrointestinal. Esse tipo de fármacos deve, portanto, ser tomado por via intravenosa. No entanto, existe uma desvantagem associada às mesmas: a sua rápida eliminação do organismo.

Por outro lado, os fármacos apolares são pouco solúveis em meios aquosos e, deste modo, são mal absorvidos através da membrana celular. No entanto, se administrados por via intravenosa, serão muito provavelmente retidos nos tecidos adiposos.

A fim de superar este obstáculo, a polaridade e/ou ionização do fármaco deve ser adaptada através da alteração dos seus grupos substituintes.

Uma forma de o fazer, é alterar o pKa do fármaco através da adição de um ácido carboxílico, o qual pode retirar elétrons da estrutura do anel aromático do composto químico (24).

Os ácidos carboxílicos são os ácidos orgânicos mais frequentemente utilizados na indústria farmacêutica (25), química (26) e alimentar (27). Nomeadamente na produção de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), de solventes na indústria de revestimentos e polímeros, ou ainda como aditivos alimentares na qualidade de agentes antimicrobianos e aromatizantes.

Os ácidos carboxílicos mais utilizados entre os produtos farmacêuticos são:

- Ácido 2-aryl-propiónico, um derivado do ácido propiónico como um dos anti-inflamatórios não esteroides mais amplamente utilizados (AINEs).
- Ácido cítrico, normalmente utilizado como excipiente conservante em preparações farmacêuticas para preservar a estabilidade da substância ativa do medicamento, devido às suas propriedades antioxidantes.
- Ácido 4-toluenossulfónico, como contra ião durante a síntese de fármacos alcalinos, dada a combinação da sua natureza hidrofílica e propriedades ácidas.
- Ácido salicílico, como matéria-prima da produção de aspirina e também em formulações para a pele, uma vez que facilita a remoção da camada exterior da pele.
- Ácido itacónico possui estrutura dicarboxílica renovável, essencial na preparação do hidrogel biocompatível, é utilizado para a libertação controlada de alguns fármacos no organismo.
- Ácido ascórbico, agente antioxidante amplamente utilizado na prevenção e tratamento de vários danos oxidativos no organismo humano.

Currently, the bio-based economy inspires an improvement in current industrial processes. Such is the large-scale production of citric acid, lactic acid, D-gluconic acid, itaconic acid, and 2-keto-L-gulononic acid. In addition, it provides the development of new fermentative approaches for the production of carboxylic acids.

However, there is a financial concern in industrial production's raw materials and processing costs, which comprise a high portion of the total production costs. Thus, it is essential to improve the segregation and recovery systems associated with the biological production of carboxylic acids by making them competitive.

- The fundamental requirements of a good ED separation process on an industrial scale are:
- High purity (most carboxylic acids requires >99.5% degree purity);
- Owning a high degree of recovery (90-100% yield);
- Require low energy and chemical consumption in the course of the recovery process;
- Involve a modest investment, with worth efficient mass and heat transfer guarantee by the recovery equipment;
- Sustainability (provides a viable solution for the retrieval of various industrial reagents).

The production of carboxylic acids (16, 28, 29, 30) may proceed by a conventional chemical/electrochemical approach or by large-scale biotransformation of the carbohydrates through fermentation by strain cultures.

Nevertheless, as the fermentation process uses renewable resources as raw materials assured by the biosphere, it is preferred over the conventional procedure for producing the organic acids because the fermentation products have a higher degree of health safety.

Although more ecologically friend, the fermentation method requires more steps to succeed during the preparation of the organic acid as the fermentation broth has several ingredients to recover/separate.

In fact, both techniques of organic acids manufacturing require competitive environmental and economic procedures, with the membrane separation technology proving their advancement in separation and purification.

Atualmente, a economia de base biológica inspira uma melhoria dos processos industriais atuais. Tal é o caso da produção em grande escala do ácido cítrico, ácido láctico, ácido D-glucônico, ácido itacônico, e ácido 2-ceto-L-gulônico. E para além disso, proporciona o desenvolvimento de novas abordagens na produção de ácidos carboxílicos por fermentação.

No entanto, existe uma preocupação financeira focada nas matérias-primas e nos custos de transformação da produção industrial, que constituem uma parte elevada dos custos totais de produção. Assim, é essencial melhorar os sistemas de segregação e recuperação associados à produção biológica dos ácidos carboxílicos, tornando-os competitivos.

- Os requisitos essenciais para um processo de separação ED eficiente à escala industrial são:
- Elevado grau de pureza (a maioria dos ácidos carboxílicos requer grau de pureza >99,5%);
- Elevado grau de recuperação (90-100% de rendimento);
- Um baixo consumo de energia e produtos químicos no decurso do processo de recuperação;
- Investimento modesto, com a garantia de uma transferência de massa e de calor eficiente por parte do equipamento de recuperação;
- Sustentabilidade (forma viável para de recuperação de vários reagentes industriais).

A produção de ácidos carboxílicos (16, 28, 29, 30) pode prosseguir através de uma abordagem química/eletroquímica convencional ou pela bio-transformação de hidratos de carbono através da fermentação por culturas mistas de leveduras.

Contudo, como o processo de fermentação utiliza recursos renováveis específicos como "matérias-primas" asseguradas pela biosfera, esta é preferível ao procedimento convencional para produzir os ácidos orgânicos, uma vez que os produtos de fermentação demonstram maior segurança sanitária.

Este método de fermentação, embora ecologicamente mais favorável, requer mais passos para ter sucesso durante a preparação do ácido orgânico, uma vez que o meio de fermentação possui vários ingredientes para a recuperação/separação.

Com efeito, ambas as técnicas de fabrico de ácidos orgânicos requerem procedimentos ambiental e economicamente competitivos, com a tecnologia de separação por membrana a provar o seu avanço na separação e purificação.

Recovery of carboxylic/organic acids from fermentative broth

In the following paragraphs, some industrial recovery processes (15,16) implemented during the production of essential carboxylic/organic acids used in particular pharmaceutical products are described.

The lactic acid (31) is a valuable component for implantable drug delivery and comes from an anaerobic fermentation by the strain *Escherichia coli*.

Lactic acid enables the preparation of the polylactic acid biopolymer (PLA), which is considered a potential candidate for a skin-dissolving polymeric matrix, releasing drugs into the body and subsequently absorbed by the body.

Lactic acid extraction from its fermentation broth may be accomplished by different ED configuration systems.

By demineralizing its salt (32), making use of a two-compartment electrodiolytic stack in which two AEM and one CEM operate, according to Figure 4.

Recuperação de ácidos carboxílicos/orgânicos do meio de cultura:

Nos parágrafos seguintes, são descritos alguns processos de recuperação industrial (15, 16) implementados durante a produção de ácidos carboxílicos/orgânicos indispensáveis em determinados produtos farmacêuticos.

O ácido láctico (31) é um componente valioso para dispositivos implantáveis de veiculação de fármacos, e resulta de uma fermentação anaeróbica pela estirpe *Escherichia coli*.

Com efeito, o ácido láctico permite a preparação do biopolímero, ácido poliláctico (PLA), que é considerado um potencial candidato a uma matriz polimérica permeável na pele, que após a veiculação do fármaco é absorvida pelo organismo.

A extração do ácido láctico do seu meio de cultura pode ser realizada através de diferentes configurações do sistema de ED.

Através da desmineralização do seu sal (32), com o recurso a uma pilha de eletrodialise de dois compartimentos onde normalmente funcionam duas MPA e uma MPC, como representado na Figura 4.

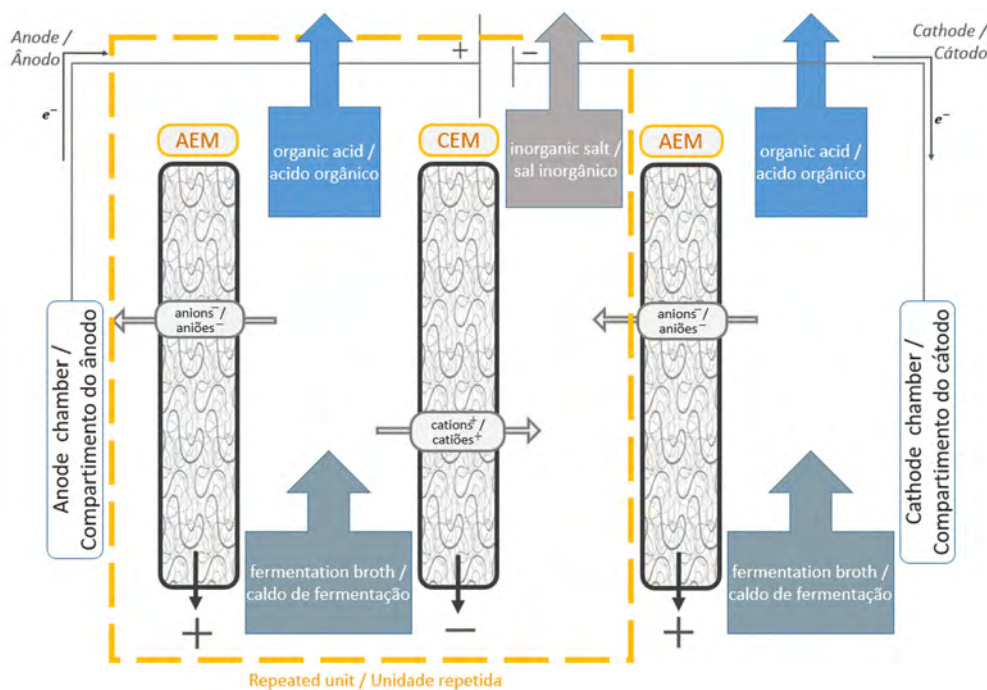


Figure 4 - Schematic diagram of the electrodiolytic system applied to demineralise organic acids or organic salts (32).
Figura 4 - Diagrama esquemático do sistema de eletrodialise aplicado à desmineralização de ácidos orgânicos ou sais orgânicos (32).

The lactic acid may also be efficiently recovered from its fermentation broth (33) through a bipolar membrane (BM) electro dialysis unit (Figure 5).

Under this electro dialytic separation system (33), Börgardts et al. reported an economical process of lactic acid production from whey, suitable for industrial scale.

The three-component bipolar cell electro dialytic configuration allows the separation of lactate from other uncharged components and further conversion to lactic acid.

Two commercial homogeneous Neosepta (ASTOM, Tokyo, Japan) cation-exchange (CMX) and anion-exchange (AMX) membranes were employed in this ED configuration, with main characteristics reported in Table 2.

Globally the process consists mainly of the milk protein concentration by ultrafiltration, then converting this lactose into lactate by fermentation with lactic acid bacteria and subsequent microfiltration by ceramic membranes.

Finally, in the recovery of the lactate ion from its fermentation broth, one should convert it into free lactic acid by bipolar electro dialysis.

O ácido láctico também pode ser eficazmente recuperado do seu meio de cultura (33) através de uma unidade de eletrodialise bipolar de três células (Figura 5).

De acordo com este sistema de separação eletrodialítico (33), Börgardts et al. relataram um processo de produção de ácido láctico adequado à escala industrial, a partir do soro de leite.

A configuração eletrodialítica de três compartimentos permitiu a separação do lactato de outros componentes não carregados e posterior conversão em ácido láctico.

Nesta configuração ED, foram utilizadas as membranas homogêneas comerciais da Neosepta (ASTOM, Tóquio, Japão) de permuta catiónica CMX e aniônica AMX, cujas principais características se encontram indicadas na Tabela 2.

Globalmente o processo consistiu na concentração da proteína do leite por ultrafiltração, convertendo depois esta lactose em ácido láctico por fermentação com recurso a bactérias e subsequente microfiltração por membranas cerâmicas.

Por fim, na recuperação do ião lactato do seu meio de fermentação, deve-se convertê-lo em ácido láctico livre por eletrodialise bipolar.

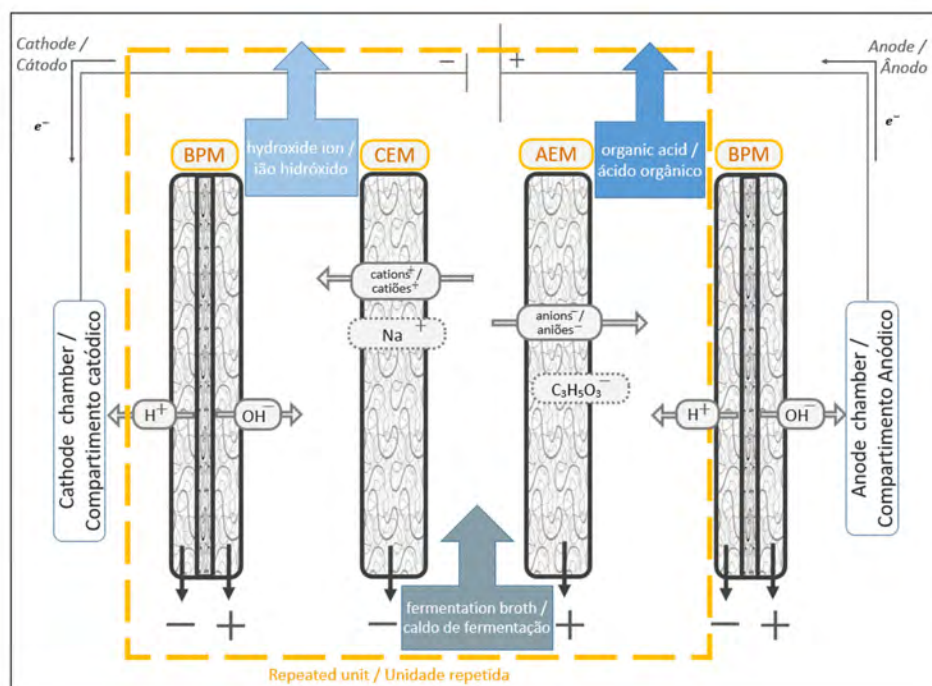


Figure 5 - Schematic representation of the three-compartment cell bipolar membrane electro dialysis applied to produce organic acids (33).

Figura 5 - Representação esquemática da células de três compartimentos para a eletrodialise por membrana bipolar aplicada na produção de ácidos orgânicos (33).

Table 2 - The main properties of homogeneous ion-exchange membranes AMX and CMX used in the electro-dialytic separation system used by Börgardt et al. for the lactic acid production (33).

Tabela 2 - As características das membranas de permuta iônica homogêneas AMX e CMX utilizadas no sistema de separação eletrodialítica utilizado por Börgardt et al. na produção de ácido láctico (33).

	AMX	CMX
Membrane type / Tipo de membrana	Homogeneous strong base anion exchange membrane / Membrana heterogênea de troca aniônica de base forte	Homogeneous strong acid cation exchange membrane / Membrana heterogênea de troca catiônica de ácidos fortes
Functional group / Grupos funcionais	Quaternary ammonium / Amina quaternária	Sulfonic acid/ Ácido sulfônico
Thickness / Espessura (mm)	0.17	0.14
Electrical resistance in 0.5 M NaCl / Resistência elétrica ($\Omega \text{ cm}^2$)	2.4	3.0
Permselectivity / Permselectividade (0.1 mol KCl kg^{-1} / 0.5 mol KCl kg^{-1})	98 ^a	98 ^a
Ion exchange capacity / Capacidade de troca iônica (meq.g ⁻¹)	1.4-1.7	1.5-1.8
Mullen burst strength test / Teste de resistência à ruptura de Mullen (MPa)	≥ 0.25	≥ 0.40
Thermal stability / Estabilidade térmica (°C)		40

With the exception of a) (35), all information presented in this table was obtained from (34). / Com a exceção de a) (35), todas as informações apresentadas nesta tabela foram obtidas de (34).

This cyclic operation made it possible to obtain concentrations of less than $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of lactate in the dilution chamber while it achieved a $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of free lactic acid in the concentrate chamber.

Nevertheless, since this is still a high-cost process, some previous broth concentration is necessary (36) and could be performed by using the ED stack schematically portrayed in Figure 6.

This BM ED procedure has been widely applied in the production of several pertinent organic acids for the pharmaceutical sector (16), such as:

- Propionic acid;
- Citric acid;
- 4-Toluenesulfonic acid;
- Salicylic acid;
- Itaconic acid;
- Ascorbic acid.

Alternatively, organic acids production may also be accomplished by the co-ion replacement (37) by using a unique form of a selective IEM. In such a case, the

Esta operação permitiu obter concentrações inferiores a $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido láctico na câmara do diluído, enquanto que atingiu $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido láctico livre na câmara do concentrado.

Contudo, este processo mostrou-se ainda dispendioso, motivo pelo qual foi posteriormente inevitável realizar uma pré-concentração do meio de fermentação antes da recuperação do ácido láctico (36). Tal pôde ser efetuado através da pilha de ED esquematicamente retratada pela Figura 6.

Este tipo de sistema ED BM tem sido amplamente implementado na produção de vários ácidos orgânicos importantes para o sector farmacêutico (16), tais como:

- Ácido propiônico;
- Ácido cítrico;
- Ácido 4-toluenossulfônico;
- Ácido salicílico;
- Ácido itacônico;
- Ácido ascórbico.

Alternativamente, a produção de ácidos orgânicos poderá ser realizada através da substituição dos co-íons (37), utilizando uma única forma de MPI seletiva.

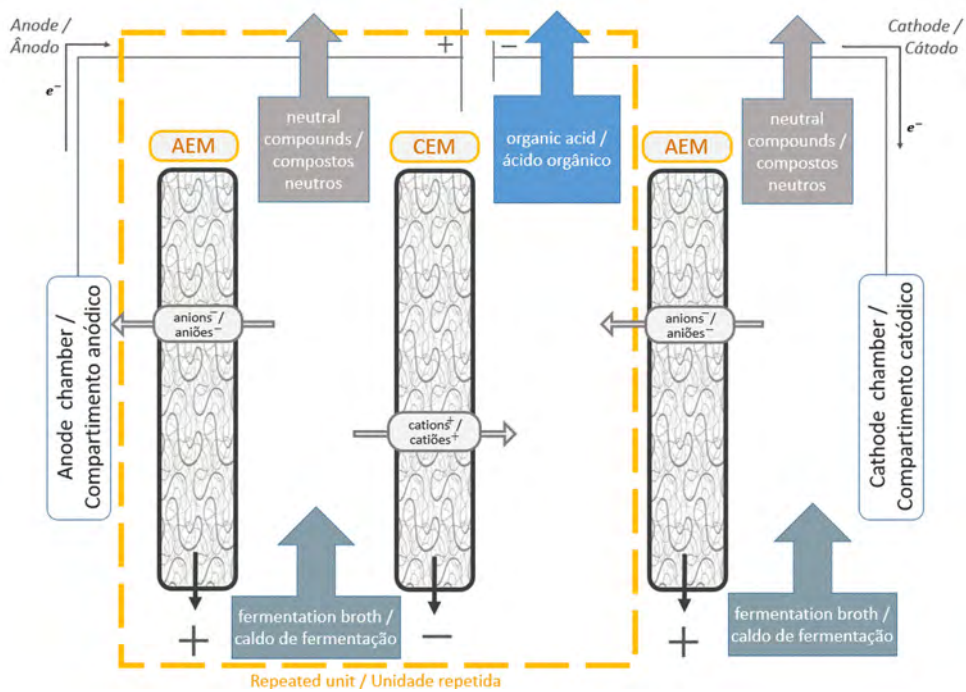


Figure 6 - Diagram of an electrodiálisis stack suitable to concentrate organic acids or organic salts (16).
Figura 6 - Diagrama de uma pilha de eletrodiálisis indicada para concentrar ácidos orgânicos ou sais orgânicos (16).

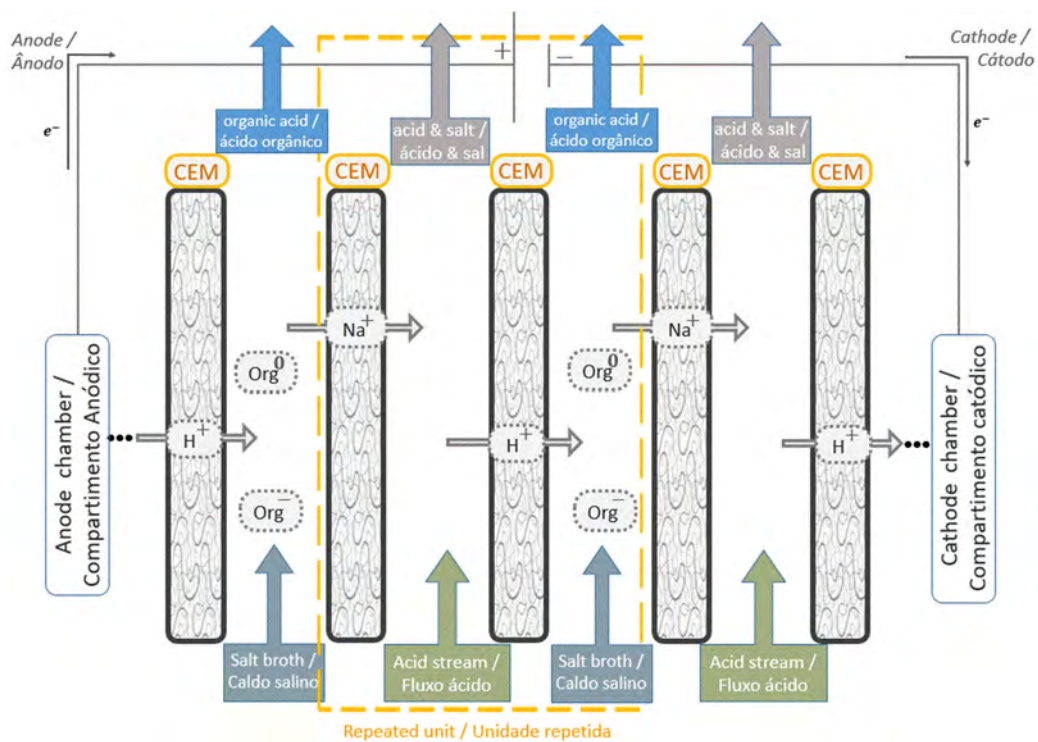


Figure 7 - Schematic diagram of the ion-substitution electrodiálisis stack employed in the lactic acid production (37).
Figura 7 - Diagrama esquemático da pilha de eletrodiálisis por substituição de iões utilizada na produção de ácido láctico (37).

lactic acid production is performed by sodium lactate organic salt desalination through the ion substitution reaction of Na^+ for H^+ . In these circumstances, the ED unit has two compartments for the acid and feed streams.

For the proton exchange reaction to occur, choosing a CEM for the ED-stack arrangement between the anode and the cathode is more convenient, as depicted in Figure 7.

Under the electric current, protons supplied by the acid stream are driven into the feed stream compartment, where they react with the negatively charged lactate anion and turn it to its neutral form.

As a result, the inorganic sodium cations Na^+ from the feed stream are equally transferred by the CEM towards the acid compartment, achieving/reaching its electroneutrality.

IEMs employed for chemical purification and recovery in pharmaceutical industry wastewater treatment

The ecological footprint of a drug (13) is nowadays maximum, with pharmaceutical residues being considered “compounds of emerging concern” and causing considerable fear, as these residuals have a large impact on human health and ecosystems.

Physical and chemical methods are among the several techniques used in removing pharmaceuticals from wastewater. Most physical methods move pharmaceuticals from an aqueous phase to a solid phase.

“Physical membrane separation technologies” are an efficient/advanced method available and appear to be the most widely viable pharmaceutical removal method.

The pharmaceutical industry pollutants have become one of the biggest threats to aquatic life with the accumulation of drugs released creating an additional development of antibiotic-resistant microbial strains that afterward reflect on human and animal health (38).

One of the most attractive proceedings used for the comprehensive removal of these pollutants is the cooperative approach that joins a decomposition procedure (e.g., the Fenton reaction) with membrane separation technology (39).

Neste caso, a unidade de eletrodialise é composta por dois compartimentos para os fluxos do ácido inorgânico e o meio de fermentação. Aqui, a produção de ácido láctico é alcançada por dessalinização do lactato de sódio através da reação de substituição iônica de Na^+ por H^+ .

É, portanto, mais conveniente colocar uma MPC entre o ânodo e o cátodo, para que a reação de troca de prótons ocorra no sistema ED, como se encontra ilustrado na Figura 7.

Assim, mediante uma corrente elétrica, os prótons fornecidos pelo fluxo de ácido inorgânico, são conduzidos para o compartimento do fluxo do meio de fermentação, onde reagem com os aniões do sal lactato e o convertem para a sua forma neutra.

Como resultado, os catiões inorgânicos de sódio do fluxo do meio de fermentação são igualmente transportados pela MPC para o compartimento do ácido, alcançando assim a sua eletroneutralidade.

MPIs para purificação e recuperação química no tratamento de águas residuais da indústria farmacêutica

Hoje em dia a pegada ecológica de um medicamento (13) é muito elevada, sendo os resíduos farmacêuticos considerados “compostos de preocupação emergente” a suscitar inquietação, uma vez esses resíduos têm um impacto considerável na saúde humana e nos ecossistemas.

Os métodos físicos e químicos estão entre as várias técnicas utilizadas na remoção de produtos farmacêuticos das águas residuais. A maioria dos métodos físicos move os produtos farmacêuticos de uma fase aquosa para uma fase sólida.

As “tecnologias de separação por membrana física” são um dos métodos mais eficientes/avançados disponíveis e parecem ser o método de remoção farmacêutica mais amplamente viável.

Os poluentes da indústria farmacêutica tornaram-se uma das maiores ameaças à vida aquática com a acumulação dos medicamentos libertados, criando um desenvolvimento adicional de estirpes microbianas resistentes aos antibióticos que depois se refletem na saúde humana e animal (38).

Um dos melhores procedimentos usados na remoção destes poluentes é a abordagem cooperativa, a qual junta um procedimento de decomposição (por exemplo, recorrendo à reação de Fenton) com a tecnologia de separação por membranas (39).

Usually, the wastewater treatment makes use of a bipolar membrane ED system. The bipolar membrane combines an AEM with a CEM that splits available water in the thin layer between these membranes into H^+ and OH^- ions (40).

This situation creates a pH difference on both sides of the bipolar membrane, setting the base for an attractive series of separations or combined reactions with partitions. The catalysis by ionically charged groups on the ion-exchange membranes fosters the water split that accounts for the pH imbalance.

The dissociative reaction of water is caused by the electric potential built up in the charged membrane layer (which acts as activation energy).

The ions generated by the water dissociation (H^+ and OH^-) are immediately taken up by the ion transport driven by the applied potential during the ED separation process. Significant pH changes thus occur on the concentrated and diluted sides of the ion-exchange membrane used (40).

During the wastewater treatment by the ED membrane process, the ions are driven to cross the AEM and CEM in opposite directions.

Due to the sequential arrangement of both types of membranes in an ED stack, there is a bias of some concentrate and dilute ED compartments'.

At some point, the ion transport towards the concentrate compartment occurs against the concentration gradient at the membrane surface (12), resulting in two types of regressions in the ED process:

1st - The rise of the flux of the ionic species that return by diffusion, given the high concentration gradient that is developed, which the flux of the transported species follows Fick's law of diffusion (according to the equation below):

$$J_x (kg/m^2s) = D \frac{dC}{dx}$$

where J_x is the flux in the direction of the xx axis, D is the diffusion coefficient of ionic species (m^2/s), and dC/dx is the concentration gradient (kg/m^4).

Such an ED back-process continues until the ionic flux against the concentration gradient equals the ionic returning diffusion flux, which corresponds to the maximum electro-dialytic effect obtained.

Normalmente, o sistema de tratamento de águas residuais faz uso de um sistema ED de membrana bipolar. A membrana bipolar combina uma MPA com uma MPC e permite dividir a água, disponível na camada fina entre estas membranas, nos iões H^+ e OH^- (40).

Esta situação cria uma diferença de pH em ambos os lados da membrana bipolar, sendo deste modo a base para uma vasta tipologia de separações ou de reações combinadas com separações. Tal dissociação da água é favorecida pela ação catalítica dos grupos com carga iónica presentes nas membranas de permuta iónica.

A reação dissociativa da água é causada pelo potencial elétrico formado/acumulado na superfície da membrana carregada (atua como energia de ativação).

Os iões gerados pela dissociação da água (H^+ e OH^-) são imediatamente canalizados através do transporte de iões, impulsionado pelo potencial aplicado durante o processo de separação de ED. Ocorrem deste modo alterações de pH significativas nos lados concentrado e diluído da membrana de troca iónica utilizada (40).

Durante o tratamento de águas residuais pelo processo ED de separação por membrana, os iões são levados a atravessar a MPA e a MPC em direções opostas.

Dada a disposição dos dois tipos de membrana iónica numa pilha ED, existe uma polarização em alguns dos compartimentos da mesma, com soluções concentradas e outras diluídas.

A certa altura, o transporte de iões para o compartimento concentrado ocorre contra o gradiente de concentração na superfície da membrana (12), resultando em dois tipos de retrocessos no processo de ED:

1^o - O aumento do fluxo das espécies iónicas que regressam por difusão, devido ao elevado gradiente de concentração que é desenvolvido em que o fluxo das espécies transportadas segue a lei de difusão de Fick (de acordo com a equação abaixo):

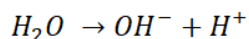
$$J_x (kg/m^2s) = D \frac{dC}{dx}$$

onde J_x corresponde ao fluxo das espécies iónicas no eixo xx , D é o coeficiente de difusão (m^2/s), e dC/dx é o gradiente de concentração das mesmas (kg/m^4).

Tal processo de retrocesso ED continua até que o fluxo iónico contrário ao gradiente de concentração seja igual ao fluxo de difusão de retorno iónico, o que corresponde ao máximo efeito eletrodialítico obtido.

2nd - Once the ions in the dilute compartment are depleted, it becomes difficult to remove further ions since insufficient ions are available to transfer electrical charge.

The electrical resistance will increase dramatically when the ions are entirely exhausted in the diluted compartment. From this point on, the remaining energy in the system is then used to split the water:



Therefore, any additional transport is limited to OH⁻ and H⁺, which is not a useful effect and decreases the efficiency of the ED system.

The electric potential intensity is more prominent in a strong acid CEM (like CMI-7000S sulfonic acid as FG) than in the strong alkaline AEM (likewise the AMI-7001S that has quaternary ammonium as FG) (12).

Therefore, the intensity of the water splitting is more constrained when a CEM is employed instead of an AEM.

In addition, the AEMs with positively charged ion-exchange groups readily attract bacteria during anaerobic wastewater treatment with microorganisms (41), accordingly, are the most often used in wastewater treatment.

Within the scope of desalting water by membrane technology, Zheng et al. (41), inspired by mussel-adhesion, have functionalised a homogeneous AEM towards their monovalent anion selectivity between Cl⁻ and SO₄²⁻ at a constant current.

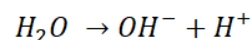
Therefore, the Zeng group prepared a modified AEM by deposition a polyelectrolyte that improved the separation selectivity of monovalent ions during a four-cell ED apparatus used to separate Cl⁻ from SO₄²⁻ (Figure 8).

Such adaptation was accomplished by installing oxidised dopamine onto the membrane's surface, forming a polymer-like coat with high adhesive strength.

In this ED system, homogeneous IEMs of polyamide matrix structure with a very low electrical resistance (purchased from Fujifilm Corp, Tokyo, Japan) were used as background polymer membranes (Table 3).

2^o - À medida que se esgotam os iões no compartimento diluído, torna-se difícil a remoção de mais iões, uma vez que não existem iões suficientes para a transferência de carga elétrica.

Quando os iões estiverem completamente esgotados no compartimento da solução diluída, a resistência elétrica aumentará dramaticamente, e a partir deste momento, a energia restante no sistema será utilizada na divisão extra da água:



Assim sendo, qualquer transporte adicional é reservado ao dos iões OH⁻ e H⁺, o que não é um efeito útil e diminui a eficiência do sistema ED.

A intensidade do potencial elétrico é mais proeminente numa MPC fortemente ácida (como o ácido sulfónico CMI-7000S como FG) do que na MPA fortemente alcalina (como o FG amina quaternária AMI-7001S) (12).

Assim, a intensidade da divisão/ionização da água é mais condicionada quando se utiliza um tipo de MPC do que com uma MPA.

De modo adicional, as MPAs com grupos de troca iônica de carga positiva atraem mais facilmente bactérias durante o tratamento anaeróbico das águas residuais por microorganismos (41), sendo, deste modo, as MPAs as mais utilizadas no tratamento de águas residuais.

No âmbito da dessalinização da água por tecnologia de membrana, Zheng et al. (41) inspirados no mexilhão, utilizaram uma MPA homogénea para a seletividade aniônica monovalente entre as espécies Cl⁻ e SO₄²⁻.

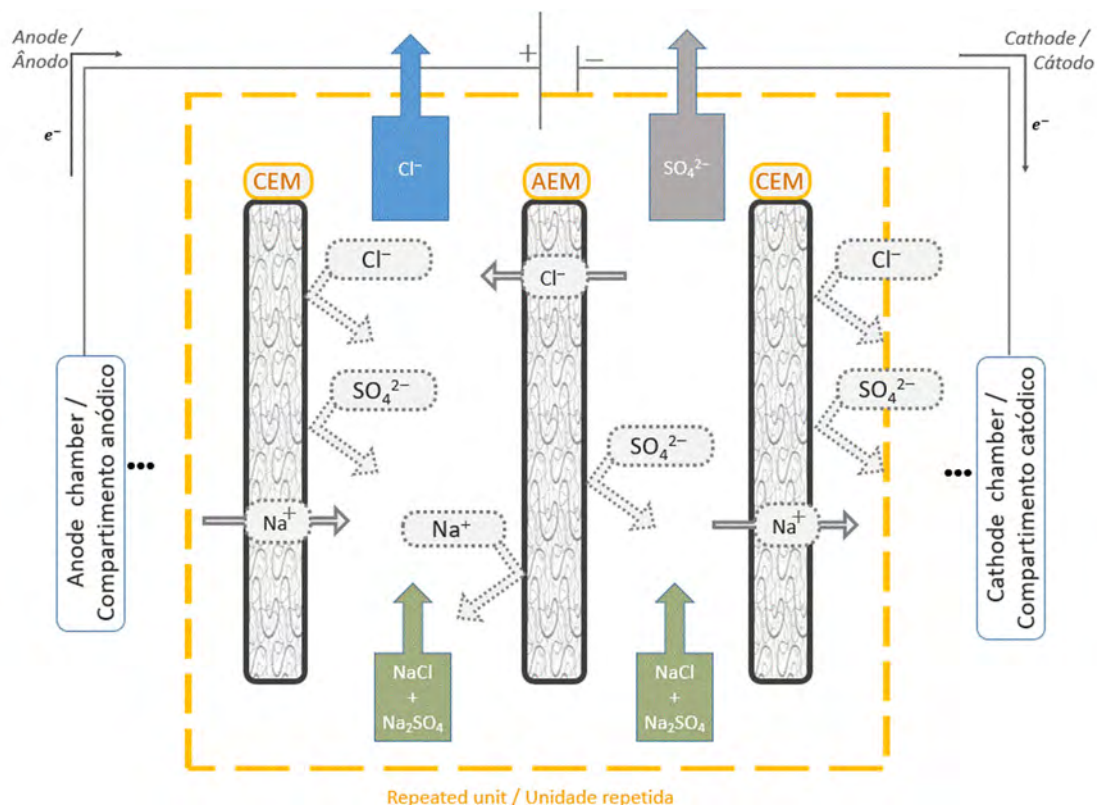
O grupo de Zeng, preparou uma MPA modificada pela deposição de um polielectrólito que melhorou a seletividade de iões monovalentes, durante o funcionamento de um sistema de ED de quatro células para separar o Cl⁻ do SO₄²⁻ (Figura 8).

Essa modificação foi conseguida pela inserção de dopamina oxidada na superfície da membrana, formando um revestimento semelhante à de um polímero com elevada força adesiva.

Neste sistema ED, foram utilizados como membranas poliméricas de base, as MPI homogéneas cuja estrutura é uma matriz de poliamida, de baixa resistência elétrica (fornecido pela Fujifilm Corp, Tóquio, Japão) (Tabela 3).

Table 3 - Some parameters of the commercial ion-exchange membranes employed in the study of Zheng et al. (41).**Tabela 3** - Alguns parâmetros das membranas de troca iônica utilizadas durante as experiências feitas por Zheng et al. (41).

	AEM-Type I	CEM-Type II
Membrane type / Tipo de membrana	Homogenous anion exchange membrane / Membrana homogênea de permuta aniônica	Homogeneous cation exchange membrane / Membrana homogênea de permuta catiônica de ácidos fortes
Polymer structure / Estrutura do polímero	Polyamide matrix / Matriz polimérica de poliamida	
Functional group / Grupos funcionais	Quaternary ammonium / Amina quaternária	Sulfonic acid / Ácido sulfônico
Thickness / Espessura (mm)	0.125	0.135
Electrical resistance in 0.5 M NaCl / Resistência elétrica ($\Omega \text{ cm}^2$)	1.3	2.7
Ion exchange capacity / Capacidade de troca iônica (meq g^{-1})	1.5	1.43

**Figure 8** - Schematic diagram of the four-cell electrodiálise stack employing an AEM altered by the insertion of a polyelectrolyte on its surface (41).**Figura 8** - Esquema da pilha de eletrodialise de quatro células usando uma AEM alterada pela inserção de um polieletrólito na sua superfície (41).

Additionally, the antibacterial action during the wastewater treatment was also amplified by incorporating silver nanoparticles onto the membrane surface.

Aiming to verify the feasibility of the ED process using ultrafiltration membrane in the purification of wastewater from the pharmaceutical industry, Lu et al. (13) investigated a proposal new ED configuration (Figure 9) for the removal of the protein bovine serum albumin (BSA) and the antibiotic penicillin G sodium (PG) from “synthetic wastewater” prepared in the laboratory.

The proposed ED separation process made use of a stack whose configuration consisted of several ion-exchange membranes (AEM and CEM) alternated with ultrafiltration membranes (UF).

The resulting EDUF configuration proved to be effective in separating similarly charged ions by separating penicillin-G⁻ anions from SO₄²⁻ anions and recovering some ions from the same “wastewaters” (Figure 9).

By combining two different ED/UF membrane separation processes, antibiotic recovery and wastewater treatment have improved the biodegradability of drug synthesis wastewater.

De modo complementar, a ação antibacteriana foi incrementada pela incorporação de nanopartículas de prata na superfície da membrana.

Tendo como objetivo verificar a viabilidade do processo de ED com recurso a membrana de ultrafiltração durante a purificação de águas residuais da indústria farmacêutica, Lu et al. (13) investigaram uma nova configuração ED (Figura 9) que permitisse remover a proteína albumina de soro bovino (BSA) e a penicilina G de sódio (PG), de algumas soluções aquosas preparadas em laboratório (“águas residuais sintéticas”).

O processo de separação ED proposto fez uso de uma pilha cuja configuração consistiu em várias membranas de permuta iônica (MPA e MPC) alternadas com membranas de ultrafiltração (UF).

A configuração ED/UF resultante provou ser eficaz na separação de iões de carga semelhante, ao separar os aniões de penicilina G⁻, dos aniões SO₄²⁻ e recuperando parcialmente outros iões das mesmas “águas residuais” (Figura 9).

Através do acoplamento de processos de separação por membrana ED com UF, foi possível a recuperação de antibióticos bem como o tratamento das águas residuais, conduzindo a um melhoramento na biodegradabilidade das águas resultantes da síntese de medicamentos.

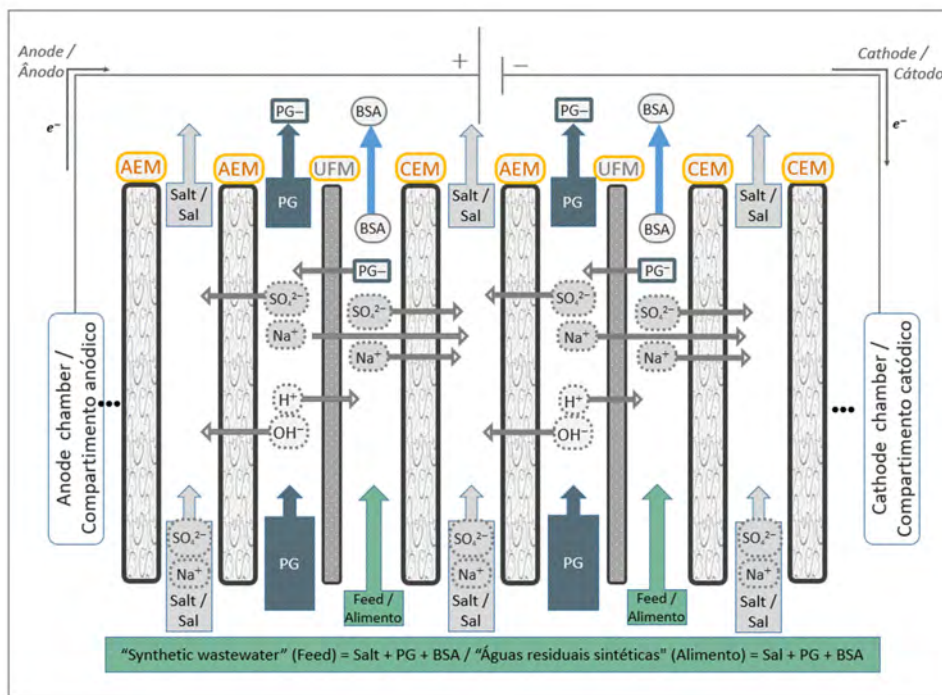


Figure 9 - Schematic diagram of the electrodesis stack employed in the wastewater treatment and antibiotic recovery (13).

Figura 9 - Representação esquemática da pilha de eletrodialise utilizada no tratamento de águas residuais para a recuperação de antibióticos (13).

Table 4 - Relevant properties of the two cation-exchange membrane separators used in the investigations by Prakash et al. (11).

Tabela 4 - As propriedades mais relevantes das membranas de troca catiónica utilizadas durante as experiencias feitas por Prakash et al. (11).

	CEM- Ionac MC-3470	CEM- Nafion® N-117
Membrane type / Tipo de membrana	Heterogeneous cation exchange membrane / Membrana heterogénea de permuta catiónica	Homogeneous cation exchange membrane / Membrana homogénea de permuta catiónica de
Polymer structure / Estrutura do polímero	Extruded polytetrafluoroethylene / Politetrafluoroetileno extrudido ^a	Combination between fabric base & stable binder / Combinação de base forte a ligante quimicamente estável ^a
Functional group / Grupos funcionais		Sulfonic acid / Ácido sulfónico
Thickness / Espessura (mm)	0.466	0.200
Electrical resistance in 1 M NaCl / Resistência elétrica (Ω cm ²)	6-10 ^b	2.0 ^b
Permselectivity / Permselectividade (0.1 mol KCl kg ⁻¹ / 0.5 mol KCl kg ⁻¹)	94 ^b	95 ^c
Ion exchange capacity / Capacidade de troca iónica (meq.g ⁻¹)	1.5 ^b	0.89 ^a
Water permeability / Permeabilidade a água (mol.h ⁻¹ .m ⁻² @ 35 kPa)	269 ^a	–

With the exception of the individually signaled data, noted by a), b), and c), which were taken from (42), (43), and (44), respectively, all information in this table was obtained from <http://www.dupont.com> and <http://www.sybronchemicals.com>.

Com exceção dos dados sinalizados individualmente, assinalados por a), b), e c), que foram retirados de (42), (43), e (44), respectivamente, todas as informações desta tabela foram obtidas de <http://www.dupont.com> e <http://www.sybronchemicals.com>.

This study allowed the development of an efficient ED technology for wastewater treatment from chemical production on an industrial level, thus making it an environmentally friendly route for the pharmaceutical industry.

In the same industrial recovery vein, Prakash et al. (11) have investigated the application of two types of CEM for the recovery of a widely used Alum-based coagulant from water treatment plants by using the Donnan membrane process: the homogeneous Nafion® N-117 membrane and the heterogeneous Ionac-3470 (Lanxess AG, Cologne, Germany).

Such an alum-based coagulant sustains the efficient removal of suspended solids and residuals colloidal particles in wastewater treatment.

The main properties of the explored strong-acid cation-exchange membranes are summarized in Table 4.

As previously mentioned, the “Donnan process” is driven by an electrochemical potential gradient, avoiding possible hindrances regarding the high turbidity of natural organic matters in the waste sludge during the recovery of the alum.

Este estudo permitiu o desenvolvimento de uma tecnologia de ED eficiente para o tratamento de águas residuais da produção química a nível industrial, tornando-a assim uma via ecológica para a indústria farmacêutica.

Na mesma ótica, Prakash et al. (11) consideraram a aplicação de dois tipos de MPC para a recuperação de um coagulante à base de alumínio numa estação de tratamento de água, recorrendo ao processo de separação por membrana Donnan. Nesta configuração ED foram utilizadas as membranas homogénea Nafion® N-117 e heterogénea Ionac-3470 (Lanxess AG, Colónia, DE).

Esse coagulante de alumínio a recuperar, sustenta a remoção eficiente de sólidos e partículas coloidais em suspensão nos resíduos das estações de tratamento de águas residuais.

As propriedades essenciais das membranas de permuta catiónica de ácidos fortes, encontram-se resumidas na Tabela 4.

Como acima mencionado, o “processo Donnan” é impulsionado por um gradiente de potencial eletroquímico, e deste modo é possível evitar possíveis obstáculos relacionados com a turbidez resultante das matérias orgânicas naturais nas lamas residuais, durante o processo de recuperação do alumínio.

Therefore, no perceptible membrane fouling was distinguished, even after multiple runs over long hours of electro dialysis operation.

Nevertheless, the alum recovery with homogeneous Nafion® N-117 membrane was over three times greater than that of heterogeneous Ionac-3470 under similar conditions.

Despite the Nafion® N-117 membrane has proved to be highly efficient in heavy metals and pollutants removal from industrial streams aqueous solutions; this membrane sustains some drawbacks:

- a) It requires a pre-treatment with H₂O₂ and HCl to activate, which in turn generates hazardous wastes;
- b) It is a high-cost manufacturing membrane, hindering its widespread use in commercial and industrial devices.

Discussion

As previously stated, membrane separation technology assists in developing innovative products more expeditiously and cost-effectively. Hence, cost is a relevant property of membranes when scaling dialysis systems.

For superior ED segregation, in addition to high conductivity and permselectivity, high mechanical strength and an economical membrane option are also desired.

Taking the approach of Morais et al. as an example, (9) it has been verified that the ion-exchange membranes analysed under the scope of energy supply (9) can be an excellent alternative to membranes used in chemical membrane separation processes.

Both membranes analysed, AMI-7000S and CMI 7001S, displayed favourable characteristics for performing ED separation, such as high permselectivity and relatively low electrical resistance (Table 1).

On the other hand, the higher thickness of the membranes strongly influences the ED separation, giving a higher resistance and reducing the crosslinking of unwanted reagents.

Por conseguinte, não se distinguiu nenhuma incrustação perceptível nas membranas utilizadas, mesmo após múltiplas passagens ao longo de longas horas de operação de eletrodialise.

Contudo, a recuperação do alumínio com membrana homogénea Nafion® N-117 foi três vezes superior à recuperação com a membrana heterogénea Ionac-3470, em condições semelhantes.

Apesar da membrana Nafion® N-117 ter provado ser bastante eficaz na remoção de metais pesados e poluentes de fluxos de soluções aquosas industriais, esta membrana sustenta alguns inconvenientes:

- a) Necessita ser ativada por um pré-tratamento com H₂O₂ e HCl, gerando resíduos perigosos;
- b) Além disso, é uma membrana com altos custos de fabrico, dificultando a sua utilização generalizada em dispositivos comerciais e industriais.

Discussão

Como anteriormente referido, a tecnologia de separação por membranas ajuda a desenvolver produtos inovadores de forma mais diligente e rentável. Deste modo, uma qualidade relevante das membranas, enquanto sistemas de diálise em escala, são os seus custos.

Para uma segregação ED superior, para além da alta condutividade e permselectividade, é igualmente desejável uma elevada resistência mecânica e uma opção de económica.

Tendo como exemplo a abordagem de Morais et al. (9), verifica-se que as membranas de permuta iónica analisadas no âmbito do fornecimento de energia (9) podem ser uma excelente alternativa aos processos de separação química de membranas.

Ambas as membranas analisadas AMI-7000S e CMI 7001S apresentam características propícias para uma eficiente separação de espécies iónicas por ED, tais como elevada permselectividade e uma resistência eléctrica relativamente baixa (Tabela 1).

Por outro lado, a maior espessura destas membranas influencia fortemente a separação por ED, conferindo uma maior resistência e reduzindo a passagem de reagentes indesejados.

It was noted that the fuel cell employing a CMI-7000S membrane exhibited better power cell performance than the AMI-7001S. This behaviour may be ascribed to the higher ohmic resistance of the AEM (Table 1).

This better performance of the cation exchange membrane CMI-7000S influences other essential properties for ED separation, such as the slower decline in the current density over time, which points to higher stability in the ion transfer between the ED cell compartments.

Indeed, the research of Prakash et al. (11) determined that heterogeneous cation exchange membranes have advantages over homologous homogeneous ones (e.g., Nafion® N-117) since they have similar dialysis results well as being easier to use and less expensive.

It should also be noted that although the lower thickness of homogeneous separation membranes (33, 41) allows them to achieve a higher power density and performance at the beginning of electro dialysis.

Nevertheless, given the periodicity of industrial dialysis processes, the membrane thickness is an essential parameter, and thus the higher thickness of the heterogeneous membranes (9) affords a greater mechanical strength.

Considering the above reflections, the two commercially viable low-cost membranes investigated by Morais et al. offer an attractive option for the membrane separation process at an industrial scale, representing an interesting alternative for future research in pharmaceutical industry processes similar to those referred to in this paper.

Note-se que a célula de combustível que utiliza uma membrana CMI-7000S demonstrou um melhor desempenho à que utilizou uma AMI-7001S como separador. Este comportamento pode ser atribuído à maior resistência óhmica da MPA (Tabela 1).

Este melhor desempenho da membrana de troca catiónica CMI-7000S reflete-se noutras propriedades essenciais para a separação ED tais como o lento decréscimo da densidade de corrente ao longo do tempo, o que indica uma maior estabilidade na transferência de iões entre os compartimentos da célula de ED.

De facto, através da investigação de Prakash et al. (11), verificou-se que as membranas de troca catiónica heterogéneas têm vantagens sobre as homogéneas homólogas (por exemplo, Nafion® N-117), uma vez que têm resultados de diálise semelhantes, além de serem mais fáceis de utilizar e menos dispendiosas.

No entanto, deve igualmente notar-se que a menor espessura das membranas de separação homogéneas (33,41) permite alcançar uma maior densidade de potência e desempenho no início da eletrodiálise.

Contudo, dada a periodicidade dos processos de diálise industrial, a espessura da membrana é um parâmetro essencial, pelo que a maior espessura das membranas heterogéneas (9) proporciona uma maior resistência mecânica.

Tendo em conta as considerações expostas, as duas membranas, comercialmente viáveis e de baixo custo, investigadas por Morais et al., oferecem uma opção atraente para o processo de separação à escala industrial, representando uma alternativa interessante para a investigação futura em processos da indústria farmacêutica semelhantes aos referidos no presente artigo.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Research Support Funding by the PADDIC (doctoral fellowship to A.M.) In addition, to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal), for financial support through projects UIDP/04567/2020 and UIDB/04567/2020.

Author Contributions

A.M., conceptualization, investigation, experimental implementation, data analysis, original draft preparation, and editing; M.N. and B.B., data analysis and review; P.R., supervision and final redaction.

Conflict of interest

The senior editor co-authoring this manuscript had no participation in the review nor in the decision process. All authors declare there were no financial and/or personal relationships that may present a potential conflict of interest.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar o seu agradecimento ao Financiamento de Apoio à Investigação por parte do PADDIC (bolsa de doutoramento à A.M.). E agradecem igualmente à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), pelo apoio financeiro concedido através dos projetos UIDP/04567/2020 e UIDB/04567/2020.

Contribuição dos Autores

A.M., conceptualização, investigação, implementação experimental, análise de dados, preparação da redação original, e edição; M.N. e B.B., análise e revisão de dados; P.R., supervisão e redação final.

Conflito de interesse

O editor senior envolvido 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. Suzman, R. & Beard, J. (2011). Global Health and Aging report from National Institute on Aging (NIA) and the World Health Organization (WHO), pp. 1-26. https://www.nia.nih.gov/sites/default/files/2017-06/global_health_aging.pdf
2. Bjegovic, J. K. (2016). Handbook on the implementation of EU environmental legislation, The European Union, <https://doi.org/10.2779/51324>
3. Singh, R. (2015). Introduction to membrane technology. In *Membrane Technology and Engineering for Water Purification, Application - Systems Design and Operation*, (2nd ed.), Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 1-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63362-0.00001-X>
4. Strathmann, H., Giorno, L., Piacentini, E., & Drioli, E. (2017). Basic Aspects in Polymeric Membrane Preparation. In *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, (2nd ed.), Elsevier Science Oxford, UK, pp. 65-84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12235-8>
5. Ariono, D., Khoiruddin, K., Subagjo S., & Wenten, G. (2017). Heterogeneous structure and its effect on properties and electrochemical behavior of ion-exchange membrane, *Materials Research Express*, 4, 024006. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa5cd4>
6. Yee, R. S. L., Rozendal, R. A., Zhang, K., & Ladewig, B. P. (2012). Cost effective cation exchange membranes: A review. *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 950-959. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.10.015>
7. Hagesteijn, K. F. L., Jiang, S., & Ladewig, B. P. (2018). A review of the synthesis and characterization of anion exchange membranes, *Journal of Materials Science*, 53, 11131-11150. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2409-y>
8. Golubenko, D.V., Pourcelly, G., & Yaroslavtsev, A.B. (2018). Permselectivity and ion-conductivity of grafted cation exchange membranes based on UV-oxidized polymethylpenten and sulfonated polystyrene, *Separation and Purification Technology*, 207, 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.06.041>
9. Paunkovic, B. S., Morais, A., Santos, D., & Sequeira, C. (2012). Anion- or Cation-Exchange Membranes for NaBH₄/H₂O₂ Fuel Cells?. *Membranes*, 2, 478-492. <https://doi.org/10.3390/membranes2030478>
10. Strathmann, H. (2010). Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new applications, *Desalination*, 264, 268-288. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.069>
11. Prakash, P., Hoskins, D., & SenGupta, A.K. (2004). Application of homogeneous & heterogeneous cation-exchange membranes in coagulant recovery from water treatment plant residuals using Donnan membrane process. *Journal of Membrane Science*, 237, 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.03.016>
12. Tanaka, Y. (2012). Mass transport in a boundary layer and in an ion exchange membrane: Mechanism of concentration polarization and water dissociation. *Russian Journal of Electrochemistry*, 48, 665-681. <https://doi.org/10.1134/S1023193512060122>
13. Lu, H., Zou, W., Chai, P., Wang, J., & Bazinet, L. (2015). Feasibility of antibiotic and sulfate ions separation from wastewater using electrodialysis with ultrafiltration membrane. *Journal of Cleaner Production*, 112, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.091>
14. Biswas, K. (2014). The Pharmaceutical Value Chain—An Introduction. In *Pharma's Prescription: How the Right Technology Can Save the Pharmaceutical Business*, Academic Press, Cambridge, UK, pp. 9-65. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407662-4.00002-7>
15. López-Garzón, C. S., & Straathof, A. J. (2014). Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnology Advances*, 32, 873-904. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.002>
16. Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., & Chen, G. (2007). Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. *Journal of Membrane Science*, 288, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.11.026>
17. Mönster, A., Villain, L., Scheper, T., & Beutel, S. (2013). One-step-purification of penicillin G amidase from cell lysate using ion-exchange membrane adsorbers. *Journal of Membrane Science*, 444, 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.05.054>
18. Kumar, M., Tripathi, B. P., & Shahi, V. K. (2010). Electro-membrane process for the separation of amino acids by iso-electro focusing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85, 648 - 657. <https://doi.org/10.1002/jctb.2348>
19. Yu, L., Lin, A., Zhang, L., Chen, C., & Jiang, W. (2000). Application of electrodialysis to the production of Vitamin C. *Chemical Engineering Journal*, 78, 153-157. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(00\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(00)00136-4)
20. Yang, W., & Xu, H. (2016). *Industrial Fermentation of Vitamin C*. 1st ed.; Wiley-VCH, New Jersey, US, pp. 161-192. <https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch7>
21. Aider, M., Brunet, S., & Bazinet, L. (2009). Effect of solution flow velocity and electric field strength on chitosan oligomer electromigration kinetics and their separation in an electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) system. *Separation and Purification Technology*, 69, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.06.020>
22. Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., & Tharanathan, R. N. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 391, 167-175. <https://doi.org/10.1042/BJ20050903>
23. Lassalas, P., Gay, B., Lasfargeas, C., James, M. J., Tran, V., Vijayendran, K. G., Brunden, K. R., Kozłowski, M. C., Thomas, C. J., Smith III, A. B., Huryn, D. M., & Ballatore, C. (2016). Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 3183-3203. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01963>
24. Karaman, R. (2013). Prodrugs Design Based on Inter- and Intramolecular Chemical Processes. *Chemical Biology & Drug Design*, 82, 643-668. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12224>
25. Lou, Y., & Zhu, J. (2016). Carboxylic Acid Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). In *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, Wiley-VCH, New Jersey, US, pp. 221-236. <https://doi.org/10.1002/9783527693931.ch16>
26. Boisier, G., Lamure, A., Pèbère, N., Portail, N., & Villatte, M. (2009). Corrosion protection of AA2024 sealed anodic layers using the hydrophobic properties of carboxylic acids. *Surface and Coatings Technology*, 203, 3420-3426. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2009.05.008>
27. Sieber, R., Butikofer, U., & Bosset, J.O. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5, 227-246. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00005-A](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00005-A)
28. Athanasiadis, I., Boskou, D., Kanellaki, M., & Koutinas, A. (2001). Effect of Carbohydrate Substrate on Fermentation by Kefir Yeast Supported on Delignified Cellulosic Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 658-663. <https://doi.org/10.1021/jf0006628>
29. Batanero, B., Barba, F., Sánchez-Sánchez, C. M., & Aldaz, A. (2004). Paired Electrosynthesis of Cyanoacetic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, 69, 2423-2426. <https://doi.org/10.1021/jo0358473>
30. Otero, M. D., Batanero, B., & Barba, F. (2006). CO₂ anion-radical in organic carboxylations. *Tetrahedron Letters*, 47, 2171-2173. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.113>
31. Wang, Y., Tian, T., Zhao, J., Wang, J., Yan, T., Xu, L., Liu, Z., Garza, E., Iverson, A., Manow, R., Finan, C., & Zhou, S. (2012). Homofermentative production of D-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 34, 2069-2075. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1003-7>
32. Thang, V. H., Koschuh, W., Kulbe, K., & Novalin, S. (2015). Detailed investigation of an electrodialytic process during the separation of lactic acid from a complex mixture. *Journal of Membrane Science*, 249, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.08.033>

33. Börgardt, P., Krischke, W., Trösch, W., & Brunner, H. (1998). Integrated bioprocess for the simultaneous production of lactic acid and dairy sewage treatment. *Bioprocess Engineering*, *19*, 321–329. <https://doi.org/10.1007/S004490050527>
34. Ryu, H-W., Kim, Y-M., & Wee, Y-J. (2012). Influence of Operating Parameters on Concentration and Purification of L-lactic Acid Using Electrodialysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *17*, 1261–1269. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0316-7>
35. Belgin, K., Filiz, T., & Altan, G. (2015). Removal of hardness by electrodialysis using homogeneous and heterogeneous ion exchange membranes. *Desalination and Water Treatment*, *54*, 8–14. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.880159>
36. Bailly, M. (2002). Production of organic acids by bipolar electrodialysis: realizations and perspectives. *Desalination*, *144*, 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00305-3)
37. Choi, J.H., Kim, S.H., & Moon, S.H. (2002). Recovery of lactic acid from sodium lactate by ion substitution using ion-exchange membrane. *Separation and Purification Technology*, *28*, 69-79. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00014-X)
38. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman Jr, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, *119*, 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
39. Ganiyu, S. O., van Hullebusch, E. D., Cretin, M., Esposito, G., & Oturan, M. A. (2015). Coupling of membrane filtration and advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residues: A critical review. *Separation and Purification Technology*, *156*, 891-914. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.059>
40. Tanaka, Y. (2010). Water dissociation reaction generated in an ion exchange membrane. *Journal of Membrane Science*, *350*, 347-360. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.01.010>
41. Zheng, Z., Xiao, P., Ruan, H., Liao, J., Gao, C., Van der Bruggen, B., & Shen, J. (2019). Mussel-Inspired Surface Functionalization of AEM for Simultaneously Improved Monovalent Anion Selectivity and Antibacterial Property. *Membranes*, *9*(3), 36. <https://doi.org/10.3390/membranes9030036>
42. Santos, D., & Sequeira, C. (2010). Polymeric Membranes for Direct Borohydride Fuel Cells: a Comparative Study. *ECS Transactions*, *25*, 111-122, <https://doi.org/10.1149/1.3315178>
43. Tanaka, Y. (2015). *Ion Exchange Membranes: Fundamentals and Applications*, (2nd ed.), Elsevier Science, Amsterdam, NL, pp. 293-316
44. Grot, W. (2011). *Fluorinated Ionomers*, (2nd ed.), Elsevier Inc., Amsterdam, NL, pp. 229-230, <https://doi.org/10.1016/C2010-0-65926-8>.

Reporting suspected adverse reactions to COVID-19 vaccines in Portugal: side effects per vaccine type, gender, and age up to July 2021

Notificação de suspeitas de reações adversas às vacinas COVID-19 em Portugal: efeitos indesejáveis por tipo de vacina, género e idade até julho de 2021

Carla Pires

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

corresponding author / autora para correspondência: p5558@ulusofona.pt

Abstract

Adverse drug reactions (ADRs) of COVID-2019 vaccines require close monitoring. This study aimed to describe and discuss the most frequent ADRs of COVID-2019 vaccines and their prevalence per age group, gender, and vaccine type in Portugal up to 22 July 2021. ADR reports of COVID-19 vaccines were collected from a public report of INFARMED, I.P. (the Portuguese Medicines Agency). There were 11,314 ADRs notified per 11,002,983 COVID-19 vaccines administered in Portugal - 1 ADR per 1,000 vaccines administered and 0.4 serious ADR per 1,000 vaccines administered. The most commonly reported ADRs were myalgia, headache, pyrexia, pain at the injection site, and fatigue. More ADRs occurred in women and younger individuals. A slightly higher percentage of reported ADRs occurred with Vaxzervria. In conclusion, ADRs were mainly related to non-serious reactions. COVID-19 vaccines maintain a favourable safety profile in Portugal, although the types and prevalence of ADRs are likely to differ between different types of COVID-19 vaccines. Men may need to be motivated to more frequently report ADRs.

Keywords: COVID-19; adverse drug reactions; vaccination; COVID-19 vaccines; pharmacovigilance

Resumo

As reações adversas a medicamentos (RAM) das vacinas COVID-2019 devem ser estreitamente monitorizadas. Objetivo do estudo: descrever e discutir as RAM mais frequentes das vacinas da COVID-2019 e a sua prevalência por faixa etária, género e tipo de vacina em Portugal até 22 julho 2021. Métodos: As notificações de RAM das vacinas COVID-19 foram identificadas a partir de um relatório público do INFARMED, IP (agência Portuguesa do Medicamento). Resultados: 11.314 RAM notificadas por 11.002.983 vacinas COVID-19 administradas em Portugal: 1 RAM por 1.000 vacinas administradas e 0,4 RAM graves por 1.000 vacinas administradas. As RAM mais comumente notificadas: mialgia, cefaleia, pirexia, dor no local da injeção e fadiga. Ocorreram mais RAM em mulheres e em indivíduos mais jovens. Verificou-se uma percentagem ligeiramente superior de notificações de RAM com Vaxzervria. Conclusão: as RAM foram predominantemente de reações não graves. As vacinas COVID-19 mantiveram um perfil de segurança favorável em Portugal, embora o tipo e prevalência de RAM possa variar entre os diferentes tipos de vacinas da COVID-19. Pode ser necessário motivar os homens a notificarem RAM.

Palavras-chave: COVID-19; reações adversas a medicamentos; vacinação; vacinas COVID-19; farmacovigilância

Introduction

Severe acute respiratory syndrome-2 virus (SARS-CoV-2) is a contagious respiratory virus, which is the causative agent of the 2019 coronavirus disease (COVID-19). COVID-19 was first reported in Wuhan, China in December 2019, with a cluster of viral pneumonia cases being reported to the World Health Organization (WHO) on 31 December 2019. SARS-CoV-2 quickly spread all over the world, with the WHO declaring the current pandemic on 11 March 2020 (1).

An unprecedented global effort was taken by the scientific community to develop vaccines against COVID-19, since vaccination was seen as the hope to build group protection, reduce disease spread and mitigate serious forms of COVID-19 (2). Impressively, diverse stakeholders publicly announced new COVID-19 vaccines in the late trimester of 2020, for example:

- 9 November 2020, Pfizer-BioNTech announced via a press release that the vaccine efficacy of BNT162b2 was greater than 90%;
- 16 November 2020, Moderna reported a 94% vaccine efficacy of mRNA-1273 via a press release;
- 8 December 2020, AstraZeneca/Oxford University reported interim results, with the viral-vectored ChAdOx1 showing an efficacy of 70% across two schedules; and
- 29 January 2021, the Johnson & Johnson (Janssen) COVID-19 single-shot vaccine showed 66% efficacy overall (1).

In the European Union (EU), there were four authorized vaccines against COVID-19 with conditional marketing authorizations granted by the European Medicine Agency (EMA) in July 2021: two mRNA-based vaccines – Comirnaty, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) (date of issue of marketing authorization valid throughout the EU 21/12/2020; International non-proprietary name (INN): COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified); tozinameran) and Spikevax, mRNA-1273 (Moderna) (date of issue of marketing authorization valid throughout the EU 06/01/2021; INN: COVID-19 mRNA vaccine, nucleoside modified), and two viral-vector based vaccines: Vaxzevria, AZD1222 (AstraZeneca) (date of issue of marketing authorization valid throughout the EU 29/01/2021; INN: COVID-19 vaccine (ChAdOx1-S [recombinant]) and COVID-19 Vaccine Janssen, Ad26.CO2.S (Janssen-Cilag) (date of issue of marketing authorization valid throughout

Introdução

O vírus da síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é um vírus respiratório contagioso. O SARS-CoV-2 é o agente causador da doença de coronavírus 2019 (COVID-19). A COVID-19 foi reportada pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019, associada a um conjunto de casos de pneumonia viral, que foram comunicados à Organização Mundial da Saúde (OMS) em 31 de dezembro de 2019. O SARS-CoV-2 espalhou-se rapidamente a nível global, com a OMS a declarar a pandemia em 11 de março de 2020 (1).

A comunidade científica fez um esforço sem precedentes para desenvolver as vacinas da COVID-19, tendo em vista a possibilidade de construir uma proteção de grupo, reduzir a propagação do vírus e mitigar formas graves de COVID-19 (2). De modo impressionante, novas vacinas da COVID-19 foram anunciadas publicamente no final do último trimestre de 2020, por exemplo:

- 9 de novembro de 2020, a Pfizer-BioNTech anunciou por meio de um comunicado à imprensa que a eficácia da vacina BNT162b2 era superior a 90%;
- 16 de novembro de 2020, a Moderna por meio de um comunicado à imprensa divulgou uma eficácia de 94% da sua vacina mRNA-1273;
- 8 de dezembro de 2020, a AstraZeneca/Universidade de Oxford comunicou os resultados provisórios relativos ao vetor viral ChAdOx1, com uma eficácia de 70% após duas tomas; e em
- 29 de janeiro de 2021, a vacina COVID-19 de toma única da Johnson & Johnson (Janssen) evidenciou 66% de eficácia (1)

Na União Europeia (UE), em julho de 2021 existiam quatro vacinas da COVID-19 autorizadas com autorização de introdução no mercado (AIM) condicional concedida pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA): duas vacinas baseadas em mRNA – Comirnaty, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) (data de AIM válida na UE 21/12/2020; Nome comum internacional (DCI): vacina de mRNA COVID-19 (modificada por nucleosídeo); tozinameran) e Spikevax, mRNA-1273 (Moderna) (data de AIM válida na UE 06/01/2021; DCI: COVID-19 vacina de mRNA (modificada por nucleosídeo) e duas vacinas baseadas em vetor viral: Vaxzevria, AZD1222 (AstraZeneca) (data de AIM válida na UE 29/01/2021; INN: vacina COVID-19 (ChAdOx1-S [recombinante]) e a vacina

the EU 11/03/2021; INN: COVID-19 vaccine (Ad26.COV2-S [recombinant]) (3, 4). Importantly, a 7.6% reduction in the case fatality ratio, 95% confidence interval (CI) = -12.6% to -2.7% ($p = 0.002$), was achieved, with a 10% increase in vaccine coverage (data from 90 countries over 25 weeks: November 2020 to April 2021) (5).

Globally, the supply and full coverage of COVID-19 vaccines is essential to control the pandemic, which is expected to occur during 2023. Several efforts are being taken by WHO, in collaboration with various countries, to ensure an equitable access to vaccines against COVID-19, although more than 80% of doses were administered to people in high-income and upper-middle-income countries through July 2021 (6). Lessons from the COVID-19 pandemic should be taken into consideration during the evaluation of future pandemic scenarios, such as protecting groups at greater risk, saving the majority of lives, and/or ensuring societal benefit, especially since the development of new vaccines may not be achieved so quickly in the case of a new pandemic virus (7).

SARS-CoV-2 is likely to become an endemic virus, and the production, distribution, supply, and administration of COVID-19 vaccines, including the update of these vaccines against possible new variants, remains an important topic. Governments and health authorities are responsible for an ethical and equitable management of the stocks of COVID-19 vaccines (7-9). It is possible that “the need for large-scale vaccination program will be transient until an endemic state for SARS-CoV-2 is reached” (9).

Possible impact of age and gender on the ADR profiles of COVID-19 vaccines

In general, adverse reactions to Comirnaty (Pfizer-BioNTech) vaccine, to Vaxzevria (AstraZeneca) COVID-19 vaccine, and to Spikevax (Moderna) COVID-19 vaccine were milder and were reported less frequently in older adults (65 years and older) than in younger people (10). However, serious ADRs, such as death, permanent disability, and hospitalization were more frequent in older adults in another study (11). For instance, reports of adverse drug reactions were significantly associated with age group, with a higher occurrence in the group ≤ 45 years ($n = 409$ healthcare personnel; AstraZeneca (AZ), Pfizer-BioNTech (PB), and SinoPharm (SP)* vaccines (12).

*A SinoPharm (SP) is not authorised for use in the European Union.

COVID-19 Janssen, Ad26.COV2.S (Janssen-Cilag) (data de AIM válida na UE 11/03/2021; INN: vacina COVID-19 (Ad26.COV2-S (recombinante))) (3, 4). De modo relevante, verificou-se uma redução de 7,6% na taxa de letalidade, intervalo de confiança de 95% (IC) = -12,6% a -2,7% ($p = 0,002$), decorrente de um aumento de 10% na cobertura vacinal (dados de 90 países ao longo de 25 semanas: novembro de 2020 a abril de 2021) (5).

O fornecimento e o nível de cobertura vacinal são essenciais para controlar a pandemia a nível mundial, o que se estima que ocorra em 2023. A OMS em colaboração com diversos países tem levado a cabo diversos esforços para garantir um acesso equitativo às vacinas da COVID-19, embora até julho de 2021 mais de 80% das doses tivessem sido administradas em países de renda alta e média-alta (6). A avaliação de cenários pandémicos futuros deve ter em conta as lições retiradas da atual pandemia, nomeadamente deve ser considerado como proteger os grupos de maior risco, salvar a maioria das vidas e/ou garantir benefícios sociais, especialmente porque o desenvolvimento de vacinas para um novo vírus pode vir a levar mais tempo (7).

O SARS-CoV-2 irá provavelmente tornar-se um vírus endémico. Em particular, a produção, distribuição, fornecimento e administração de vacinas da COVID-19, incluindo a atualização dessas vacinas contra possíveis novas variantes continua a ser uma questão pertinente. Os governos e as autoridades de saúde são responsáveis por uma gestão ética e equitativa dos stocks de vacinas da COVID-19 (7-9). É possível que “a necessidade programas de vacinação em larga escala seja transitória até o SARS-CoV-2 alcançar uma fase endémica” (9).

Possível impacto da idade e do género nos perfis de RAM das vacinas COVID-19

Em geral, as reações adversas à vacina Comirnaty (Pfizer-BioNTech), à vacina AstraZeneca COVID-19 e à vacina Spikevax (Moderna) COVID-19 foram menos graves e notificadas com menos frequência em adultos com 65 ou mais anos comparativamente aos mais jovens (10). Ainda que, num outro estudo, RAM graves, como morte, incapacidade permanente e hospitalização, foram mais frequentes em idosos (11). Por exemplo, uma maior ocorrência (estatisticamente significativa) de reações adversas nos mais jovens (grupo ≤ 45 anos) também se verificou num estudo com a participação de $n = 409$ profissionais de saúde (vacinas: AstraZeneca Vaxzevria (AZ), Pfizer-BioNTech (PB) e SinoPharm (SP)* (12).

*A SinoPharm (SP) não está autorizada para uso na União Europeia.

Women tend to be more prone to have more adverse events following vaccination in comparison to men, because women usually produce immunity responses, such as higher antibodies levels (13-14). In a questionnaire-based survey (German Healthcare Workers, February–March 2021; n = 599), the local and systemic side effects were not statistically significant between women and men in the case of mRNA-based vaccines: Comirnaty (BNT162b2, Pfizer-BioNTech) and Spikevax (mRNA-1273, Moderna) vaccine, but statistically significant differences were found between women and men for local and systemic side effects in the case of the viral vector-based vaccine Vaxzevria (AstraZeneca), with women reporting a higher proportion of side effects (15). In opposition to these findings, gender was not identified as a significant risk factor of AstraZeneca COVID-19 vaccine side effects among European healthcare workers during February–March 2021 (U = 680; p = 0.539) (16). Age and gender did not significantly affect the duration and severity of adverse events in a study of 1,736 individuals who had received a first or second dose of the vaccine (Pfizer-BioNTech, AstraZeneca or AstraZeneca-Oxford, and Sinopharm) at least 30 days before the survey (17).

ADRs per type of COVID-19 vaccine

mRNA vaccines present a safe profile and a limited number of side effects. Common side effects included heat, pain, swelling and erythema at the injection site, fever and chills, fatigue, headaches, decreased appetite, myalgia (muscle pain), arthralgia (joint pain). Serious adverse reactions included anaphylaxis/anaphylactic shock and Bell's palsy (18-20). Among the reported local and systemic side effects of the AstraZeneca COVID-19 vaccine were injection site pain, injection site swelling, injection site redness, fatigue, headache, nausea, feeling unwell, myalgia, arthralgia, fever, chills, or lymphadenopathy. In addition, oral and skin-related side effects were also reported, such as, ulcers/blisters/vesicles, white/red plaque, halitosis, bleeding gingiva, swollen lips, taste alterations, or skin rash (16). Similar to other COVID-19 vaccines, local reactions (e.g., pain, erythema, or swelling) and/or systemic reactions (e.g., headache, fatigue, myalgia, nausea, or fever) were also reported with the single-dose Janssen Ad26.COVS vaccine against COVID-19 (21).

As mulheres tendem a ser mais propensas a manifestar reações adversas decorrentes da vacinação comparativamente aos homens, porque a resposta em imunitária, por exemplo em termos de aumento de anticorpos é geralmente superior no género feminino (13-14). Num estudo efetuado por questionário (profissionais de saúde Alemães, fevereiro-março de 2021; n = 599), os efeitos indesejáveis locais e sistémicos não foram estatisticamente significativas entre mulheres e homens no caso das vacinas baseadas em mRNA (vacina Pfizer-BioNTech (BNT162b2) e a vacina Spikevax (Moderna) (vacina mRNA-1273), mas foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre mulheres e homens relativamente aos efeitos indesejáveis locais e sistémicos no caso da vacina baseada em vetor viral (vacina da AstraZeneca), com uma proporção superior de efeitos indesejáveis nas mulheres (15). Opostamente, o género não foi identificado como um fator de risco significativo de efeitos indesejáveis com a vacina AstraZeneca COVID-19 entre profissionais de saúde (U = 680; p = 0,539) (fevereiro-março de 2021) (16). A idade e o género também não se relacionaram significativamente com a duração e a gravidade dos efeitos indesejáveis num estudo com 1.736 indivíduos que receberam uma primeira ou segunda dose da vacina Pfizer-BioNTech, AstraZeneca ou AstraZeneca-Oxford e Sinopharm, pelo menos 30 dias antes da distribuição do questionário (17).

RAM por tipo de vacina COVID-19

As vacinas mRNA apresentam um perfil seguro e um número limitado de efeitos secundários. Os efeitos secundários comuns incluem calor, dor, inchaço e eritema no local da injeção, febre e arrepios, fadiga, cefaleia (dores de cabeça), diminuição do apetite, mialgia (dor muscular), artralgia (dor nas articulações). As reacções adversas graves incluíram anafilaxia/anafilática e paralisia de Bell (18-20). Entre as RAM locais e sistémicas da vacina AstraZeneca COVID-19 estão: dor, vermelhidão ou inchaço no local da injeção, fadiga, cefaleia, náusea, mal-estar, mialgia, artralgia, febre, calafrios ou linfadenopatia. Além disso, também foram notificados efeitos indesejáveis orais ou dermatológicos, como úlceras/bolhas/vesículas, placa branca/vermelha, halitose, sangramento gengival, lábios inchados, alterações no paladar ou erupções cutâneas (16). De modo semelhante a outras vacinas, uma única dose da vacina da COVID-19 Ad26.COVS também levou a reacções locais (p.ex., dor, eritema ou inchaço) e/ou reacções sistémicas (p.ex., cefaleia, fadiga, mialgia, náusea ou febre) (21).

Moreover, different COVID-19 vaccines may differ in terms of ADR frequency and/or type. For example, the incidence of adverse drug reactions was higher among recipients after one dose of AZD1222 (Vaxzevria, AstraZeneca) than in those with the first and the second dose of the BNT162b2 vaccine (Comirnaty, Pfizer-BioNTech) (80 and 1,440 healthcare workers who received two doses of BNT162b2 and one dose of the AZD1222 vaccines, respectively) (22). A recent review pointed out that the “pooled rates of local and systemic reactions were significantly lower among inactivated vaccines (23.7%, 21.0%), protein subunit vaccines (33.0%, 22.3%), and DNA vaccines (39.5%, 29.3%), compared to RNA vaccines (89.4%, 83.3%), non-replicating vector vaccines (55.9%, 66.3%), and virus-like particle vaccines (100.0%, 78.9%)”. The frequency of serious adverse events was low for all studied vaccines (<0.1%) (23).

Thus, the aim of this study was to describe and discuss the safety data of COVID-19 vaccines in Portugal (cumulative occurrences until 22 July 2021), including the most reported ADRs and the profile of ADRs per vaccine type, gender and age.

Materials and Methods

Definition of adverse reaction

Adverse reaction synonyms used in this paper: Adverse drug reaction (ADR), adverse event or side effect. An ADR is a “response to a medicinal product which is noxious and unintended [DIR 2001/83/EC Art 1(11)]” (24). Side effects, also known as adverse events, are unwanted or unexpected events or reactions to a drug (25).

An adverse event following immunization is defined as “any untoward medical event that follows immunization and that does not necessarily have a causal relationship with the usage of the vaccine. The adverse event may be any unfavourable or unintended sign, abnormal laboratory finding, symptom, or disease” (26).

Data sources

Data were collected from two recent publications of INFARMED, I.P. (the Portuguese Medicine Agency), which correspond to the data from the same report, regarding the safety of COVID-19 vaccines in Portugal up to 22 July 2021. These reports are public, and aggregate data from all reported ADR, which are

Além disso, as diferentes vacinas da COVID-19 pode diferir em termos de frequência e/ou tipo de RAM. Por exemplo, a incidência de efeitos indesejáveis foi maior após uma dose de AZD1222 (Vaxzevria, AstraZeneca) comparativamente a um grupo com a primeira e a segunda dose da vacina BNT162b2, Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (80 e 1.440 profissionais de saúde que receberam duas doses de BNT162b2 e uma dose da vacina AZD1222, respetivamente) (22). Uma revisão recente apontou que as “taxas combinadas de reações locais e sistémicas foram significativamente menores entre vacinas inativadas (23,7%, 21,0%), vacinas com subunidades proteicas (33,0%, 22,3%) e vacinas de DNA (39,5%, 29,3%), em comparação com vacinas de RNA (89,4%, 83,3%), vacinas de vetor não replicante (55,9%, 66,3%) e vacinas de partículas semelhantes a vírus (100,0%, 78,9%).” A frequência de reações adversas graves foi baixa para todas as vacinas estudadas (<0,1%) (23).

Assim, o objetivo do presente estudo é descrever e discutir os dados de segurança das vacinas da COVID-19 em Portugal (ocorrências cumulativas até 22 julho 2021), incluindo as RAM mais notificadas e o seu perfil por tipo de vacina, género e idade.

Material e Métodos

Definição de reação adversa

Sinónimos de reações adversas no presente trabalho: reação adversa a medicamentos (RAM) ou reação adversa. Uma RAM é uma “resposta a um medicamento que é nociva e não intencional [DIR 2001/83/EC Art 1(11)]” (24, 25).

Note-se, que uma reação adversa após uma imunização é definida como “qualquer reação clínica desfavorável que se segue à imunização e que não tem necessariamente uma relação causal com o uso da vacina. A reação adversa pode ser qualquer sinal desfavorável ou não intencional, achado laboratorial anormal, sintoma ou doença” (26).

Fontes de dados

Os dados foram recolhidos a partir de duas publicações recentes do INFARMED, I.P. (a agência Portuguesa do Medicamento), que correspondem aos dados do mesmo relatório, sobre a segurança das vacinas COVID-19 em Portugal até 22 julho 2021. Estas publicações baseiam-se em dados públicos de todas as RAM notificadas,

potentially related to COVID-19 vaccines up to 22 July 2021 within Portugal (27-28).

Self-reporting of ADRs

The reporting of a suspected side effect(s) *per se* does not reflect any confirmation of a potential link between the medicinal product/vaccine and the observed effect(s) and should not be used to determine the likelihood of a certain side effect. The causal relationship between taking a medicine and an ADR is established by specialists from different expertise areas through the application of both qualitative and quantitative techniques. Thus, it is possible to determine if an ADR is consequence of taking a certain medicine or if it is a mere coincidence (27-28, 30-31). All suspected ADRs may be reported online by health professionals or patients/citizens in Portugal (<https://www.infarmed.pt/web/infarmed/submissaoram>). Only four elements are necessary to produce a valid Individual Case Safety Report (ICSR): “one identifiable reporter, one single identifiable patient, at least one suspect adverse reaction, and at least one suspect medicinal product”. After receipt and validation, the information is evaluated by a team of experts (pharmacists and physicians). Finally, the fully anonymized information is sent to European and worldwide ADR databases, Eudravigilance, and Vigibase, respectively, for the purpose of a more comprehensive and continuous evaluation of the medicinal product's safety profile (29). According to the INFARMED, I.P.'s report, it is likely that some patients have opted not to report the suspected ADR, because of the lack of severity and/or if the ADR was already known (27-28).

Serious ADRs were categorised according to the WHO classification as follows: persistent or significant disability/incapacity; congenital anomaly; life threatening, death or other clinically relevant. ADRs are described by the subject who reports the ADR: a healthcare professional and/or a citizen/patient, and if at least one ADR is classified as serious, the case is also classified as serious (26-28).

COVID-19 vaccines

The COVID-19 vaccines administered in Portugal up to July 2021 were Comirnaty (BNT162b2, Pfizer-BioNTech) and Spikevax (mRNA-1273, Moderna) (both mRNA-based vaccines), along with Vaxzevria, (AZD1222, AstraZeneca) and the Janssen COVID-19 vaccine (Ad26.COV2.S, Janssen-Cilag) (viral-vector-based vaccines). These vaccines are also used in EU (3, 4).

que são potencialmente relacionadas com as vacinas da COVID-19 até 22 julho 2021 em Portugal (27-28).

Auto-notificação de RAM

As notificações de suspeita de RAM *per se* não comprovam qualquer potencial relação entre o medicamento/vacina e o(s) efeito(s) indesejável (indesejáveis) observado(s). O nexo de causalidade entre uma RAM e a toma de determinado medicamento é estabelecida através de técnicas qualitativas e quantitativas por especialistas de diversas áreas. Estas técnicas permitem determinar se a RAM foi consequência da toma de determinado medicamento ou se foi apenas uma mera coincidência, que nada tem a ver com a toma do medicamento (27-28, 30-31). Todas as suspeitas de RAM podem ser notificadas online por profissionais de saúde ou doentes/cidadãos em Portugal (<https://www.infarmed.pt/web/infarmed/submissaoram>). Apenas quatro elementos são necessários para produzir um relatório de segurança de caso Individual (RSCI) válido: a(s) suspeita(s) de RAM; o(s) nome(s) do(s) medicamento(s) provavelmente relacionado(s); dados do doente (como iniciais ou idade ou género); e o meio de contato do notificador. Após receção, as informações são avaliadas/validadas por uma equipa de especialistas (farmacêuticos e médicos). Por último, de um modo totalmente anónimo, a informação é enviada para as bases de dados de RAM: europeia (Eudravigilance) e da OMS (Vigibase) para avaliação compreensiva e continua do perfil de segurança dos produtos medicinais (29). De acordo com o relatório do INFARMED, I.P., é possível que alguns indivíduos tenham optado por não notificar a suspeita de RAM devido à sua falta de gravidade e/ou por a RAM já ser conhecida (27-28).

As RAM graves foram organizadas de acordo com a classificação da OMS como a seguir se apresenta: incapacidade persistente ou significativa; hospitalização; anomalia congénita; risco de vida, morte ou outras clinicamente relevante. É de salientar, que quem notifica (profissional de saúde e/ou cidadão/doente) descreve a RAM, e se pelo menos uma RAM for grave, o caso também é classificado como grave (26-28).

Vacinas COVID-19

As vacinas da COVID-19 administradas em Portugal até Julho de 2021: Comirnaty, (BNT162b2, Pfizer-BioNTech) e Spikevax, (mRNA-1273, Moderna) (duas vacinas baseadas em mRNA), Vaxzevria (AZD1222, AstraZeneca) e vacina COVID-19 Janssen, (Ad26.COV2.S, Janssen-Cilag) (duas vacinas baseadas em vetor viral). Estas vacinas também são utilizadas nos restantes países da UE (3, 4).

Results

Up to 22 July 2021, the number of cumulative administered vaccines was 11,002,983. According to the findings of the last national census (2021), there are 9,860,175 inhabitants in Portugal (4,684,642 men and 5,175,533 women) (32).

Reported ADRs

The cumulative number of reported ADRs was 11,314 (100%) up to 22 July 2021 (36% serious and 64% non-serious): 1 ADR per 1,000 administered vaccines in Portugal, and 0.4 serious ADRs per 1,000 administered vaccines in Portugal (27-28). From the n=11,314 (100%) reported ADRs, the 15 most reported ADRs are presented in Table 1. The three most frequent ADRs were myalgia, headache, and pyrexia, with similar percentages (Table 1).

Resultados

Até 22 julho 2021, o número cumulativo de vacinas administradas em Portugal foi de 11.002.983. De acordo com os resultados do último censo nacional (2021), existem 9.860.175 habitantes em Portugal (4.684.642 homens e 5.175.533 mulheres) (32).

RAM notificadas

O número acumulado de RAM notificadas foi de 11.314 (100%) até 22 julho 2021 (36% graves e 64% não graves), com uma 1 RAM ou 0,4 RAM graves por cada 1.000 vacinas administradas em Portugal (27- 28). Das 11.314 (100%) RAM notificadas, as 15 RAM mais notificadas podem ser consultadas na Tabela 1. As três RAM mais frequentes foram mialgia, cefaleia e pirexia, com percentagens semelhantes (Tabela 1).

Table 1 - Most reported ADRs (27-28)

Tabela 1 - RAM mais notificadas (27-28)

ADR / RAM	N	%
Myalgia / Mialgia	3044	26.9
Headache / Cefaleia	2927	25.9
Pyrexia / Pirexia	2830	25
Pain at the injection site / Dor no local de injeção	2567	22.7
Fatigue / Fadiga	1288	11.4
Chills / Calafrios	1232	10.9
Nausea / Náusea	1148	10.1
Artralgia / Artralgia	913	8.1
Generalized pain / Dor generalizada	711	6.3
Lymphadenopathy / Linfadenopatia	642	5.7
Dizziness / Tontura	638	5.6
General malaise / Mal-estar geral	620	5.5
Asthenia / Astenia	546	4.8
Vomiting / Vômitos	538	4.8
Pain in the extremities / Dor nas extremidades corporais	534	4.7

Administered vaccines and ADRs per vaccine type

Of the 11,002,983 (100%) administered vaccines in Portugal, 67.4% (n = 7,412,497) were Comirnaty (Pfizer-BioNTech), 18.2% (n = 2,003,932) were Vaxzevria (AstraZeneca), 10.4% (n = 1,141,821) were Spikevax (Moderna), and 4.0% (n = 444,733) were the Janssen COVID-19 Vaccine (Janssen-Cilag) (Figure 1) (27-28). The number of reported ADRs per vaccine type up to 22 July 2021 were as follows: Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (n = 6,485), Spikevax (Moderna) (n = 970), Vaxzevria (AstraZeneca) (n = 3,480), and COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen-Cilag) (n = 379), with the highest number of reported ADRs per 1,000 administered vaccines for Vaxzevria (AstraZeneca) (1.7), followed by Comirnaty (Pfizer-BioNTech) and COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen-Cilag), with equal values (0.9), and the lowest value for Spikevax (Moderna) (0.8) (28).

ADRs per gender

The reporting of suspected ADRs was more prevalent in women (n = 7,800, 68.9%) than men (n = 2,615, 23.1%). The sex was classified as unknown in 7.9% of ICSR (n = 899) (27-28).

Vacinas administradas e RAM por tipo de vacina

Das 11.002.983 (100%) vacinas administradas em Portugal: 67,4% (n = 7.412.497) Comirnaty (Pfizer-BioNTech), 18,2% (n = 2.003.932) Vaxzevria (AstraZeneca), 10,4% (n = 1.141.821) Spikevax (Moderna) e 4,0% (n = 444.733) a vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) (Figura 1) (27-28). O número de RAM notificadas por tipo de vacina até 22 julho 2021 foi o seguinte: Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (n = 6.485), Spikevax (Moderna) (n = 970), Vaxzevria (AstraZeneca) (n = 3.480) e a vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) (n = 379), com o número mais alto de RAM notificadas por 1.000 vacinas administradas para a Vaxzevria (AstraZeneca) (1,7), seguido da Comirnaty (Pfizer-BioNTech) e da vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag), com valores iguais (0,9) e com o menor valor a Spikevax (Moderna) (0,8) (28).

RAM por género

A notificação de suspeita de RAM foi mais prevalente em mulheres (n = 7.800, 68,9%) comparativamente aos homens (n = 2.615, 23,1%). Em 7,9% dos casos (n = 899) o género foi classificado como desconhecido (27-28).

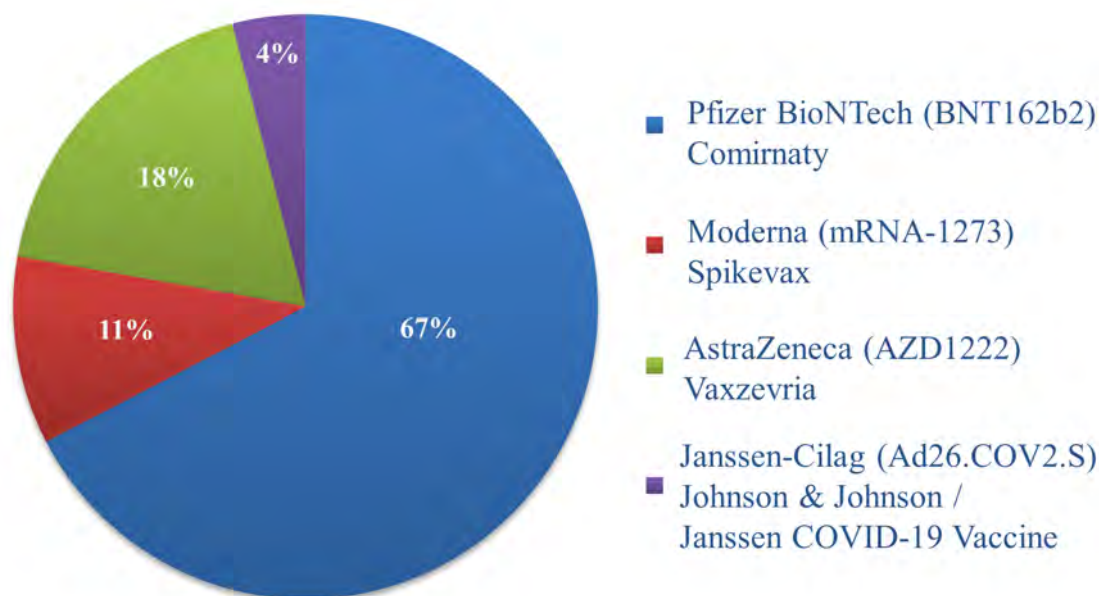


Figure 1 - Percentage of vaccines administered by brand in Portugal (27-28).

Figura 1 - Percentagem de vacinas administradas por marca em Portugal (27-28).

Table 2 - Distribution of reported ADR per age group (27-28)
Tabela 2 - Distribuição de RAM notificadas por faixa etária (27-28)

Age group (years old) / Faixa etária (número de anos)	Serious ADR / RAM grave	Non-serious ADR / RAM não grave
<2*	0	7
2-15	0	0
16-19**	11	4
20-29	377	771
30-39	702	1359
40-49	842	1368
50-59	720	1192
60-69	482	800
70-79	345	516
80-89	207	166
≥90	59	51
Unknown / Desconhecido	268	1067
Total (%)	4015 (36%)	7299(64%)

* All reported ADR were non-serious, such fever, regurgitation, or irritability in children whose mothers had been vaccinated. /

* Todas as RAM notificadas foram não graves, como febre, regurgitação ou irritabilidade em crianças cujas mães foram vacinadas.

** The serious ADR were not related to sequelae. These serious events were related to already known ADR (i.e., ADR described in Summaries of Product Characteristics (SmPC) and in Package Leaflets (PL)), such as allergic reactions./

** As RAM graves notificadas não estavam relacionadas com sequelas. Esses eventos graves foram relacionados a RAM já conhecidas (ou seja, RAM descritas nos Resumos das Características dos Medicamentos (RCM) e Folhetos Informativos (FI) das vacinas), como reações alérgicas.

Table 3 - Distribution of the reported ADRs per age group and with at least one dose of COVID-19 vaccine (27-28).
Tabela 3 - Distribuição da RAM notificadas por faixa etária e pelo menos uma dose da vacina COVID-2019 (27-28).

Age group / Grupo etário	At least one vaccine dose / Pelo menos uma dose de vacina	Serious / Grave	% of serious cases per (at least) one dose / % de casos graves por pelo menos uma dose	Non serious / Não-grave	% of non-serious cases per (at least) one dose / % de casos não graves por pelo menos uma dose	Total*	% of total cases per (at least) one dose / % Total de casos por pelo menos uma dose
0-49	2531237	1932	0.076	3509	0.139	5441	0.215
50-79	3654721	1547	0.042	2508	0.069	4055	0.111
≥80	679085	266	0.039	217	0.032	483	0.071

*Serious plus non-serious / * Grave mais não grave

ADRs per age group and at least one dose of COVID-19 vaccine

The distribution of the reported ADRs per age group is presented in Table 2. The distribution of the reported ADR (serious vs. non-serious and total) per age group (up to 22 July 2021) and at least one dose of COVID-2019 vaccine (up to 25 July 2021)¹ is presented in Table 3. (27-28).

¹DGS – Direcção Geral de Saúde. Portuguese Report of Vaccination. Week 29 (27/12/2020 to 25/07/2021). Available online: https://static-storage.dnoticias.pt/www-assets.dnoticias.pt/documents/Relatorio_Vacinacao_Week29.pdf

RAM por faixa etária e por pelo menos uma dose da vacina COVID-19

A distribuição de RAM notificadas por faixa etária encontra-se na Tabela 2. A distribuição de RAM notificadas (graves vs. não graves e total) por faixa etária (até 22 julho 2021) e pelo menos uma dose da vacina COVID-2019 (até 25 julho 2021)¹ está disponível na Tabela 3 (27-28).

¹DGS – Direcção Geral de Saúde. Portuguese Relatório de vacinação. Semana 29 (27/12/2020 até 25/07/2021). Disponível online: https://static-storage.dnoticias.pt/www-assets.dnoticias.pt/documents/Relatorio_Vacinacao_Week29.pdf

The percentage (serious, non-serious and total) of reported ADRs with at least one dose of COVID-19 vaccine decreased per age group (i.e., % of ADRs per age groups: 0-49 > 50-79 ≥ 80). The highest % was found in the group of 0-49 years old, followed by the groups of 50-79 years old and ≥80 years old, respectively (Table 3). It should be considered that ADRs were reported up to 22 July 2021, but the number of vaccinated people with at least one dose was only identified on 25 July 2021 (Table 3).

Discussion

The most reported ADRs

Among the most frequently reported ADRs of COVID-19 vaccines have been pain, swelling, fever, fatigue, chills, myalgia, arthralgia, headache, itching, and redness (33-35). Other local and/or systemic ADRs were also reported, such as vomiting, nausea, or dizziness (34-35). Thus, the most reported ADRs in the present study seems to be congruent with those reported in the literature, which contributes to supporting the validity of the data from the present study.

According to INFARMED, I.P., the most reported ADRs were within the reactogenic profile of any vaccine. These ADRs were identified during clinical trials of COVID-19 vaccines and are included in Summaries of Product Characteristics (SmPC) and in Package Leaflets (PL). Approximately 15.3 million COVID-19 vaccine doses were given in Australia up to 15 August 2021: the most frequent side effects included injection-site reactions, headache, myalgia, fever, and chills, which are among the most reported side effects in Portugal up to 22 July 2021 (33).

In general, the discomfort associated with these ADRs was resolved in a few hours/days, without the need of medical intervention and without (further) sequelae (27-28, 33). A study including 599 German healthcare workers reported that the majority (84.9%) of side effects resolved within 1–3 days after vaccination: Comirnaty (Pfizer-BioNTech) and Spikevax (Moderna) vaccine (mRNA-based vaccines; n = 474), and 125 Vaxzevria (AstraZeneca) (viral vector-based vaccine) (36).

A percentagem de RAM (graves, não graves e total) notificadas por sujeitos com pelo menos uma dose da vacina COVID-19 diminuiu por faixa etária (i.e., % de RAM por grupo etário: 0-49 > 50-79 ≥ 80). A maior % de RAM foi identificada no grupo de 0-49 anos, seguida dos grupos de 50-79 anos e ≥80 anos, respetivamente (Tabela 3). Deve-se considerar que as RAM foram notificadas até 22 julho 2021, mas o número de vacinados com pelo menos uma dose foi identificado em 25 de julho de 2021 (Tabela 3).

Discussão

RAM mais notificadas

Entre as RAM das vacinas da COVID-19 mais frequentemente notificadas estão: dor, inchaço, febre, fadiga, calafrios, mialgia, artralgia, cefaleia, prurido e vermelhidão (33-35). Além destas, também foram notificadas outras RAM locais e/ou sistêmicas, nomeadamente vômitos, náuseas ou tonturas (34-35). Assim, as RAM mais notificadas no presente estudo parecem ser congruentes com as descritas na literatura, o que contribui para corroborar a validade dos dados.

De acordo com o INFARMED, I.P., as RAM mais notificadas estão dentro do perfil de RAM reatogénicas de qualquer vacina. Essas RAM foram identificadas durante os ensaios clínicos das vacinas da COVID-19 e estão incluídas nos resumos de características dos medicamentos (RCM) e nos folhetos informativos (FI). Aproximadamente 15,3 milhões de doses da vacina da COVID-19 foram administradas na Austrália até 15 agosto 2021: os efeitos indesejáveis/RAM mais frequentes incluem reações no local da injeção, cefaleia, mialgia, febre e calafrios, que também se encontram entre os efeitos indesejáveis/RAM mais notificados em Portugal até 22 julho 2021 (33).

Em geral, as RAM resolveram-se em poucas horas/dias, sem necessidade de intervenção médica e sem deixar sequelas (27-28, 33). Além disso, a maioria das RAM (84,9%) regrediram/resolveram-se no prazo de 1 a 3 dias após a vacinação num estudo com 599 profissionais de saúde alemães: vacinas da Comirnaty (Pfizer-BioNTech) e da Spikevax (Moderna) (vacinas baseadas em mRNA; n = 474) e 125 da AstraZeneca (vacina baseada em vetor viral) (36).

ADRs per age group and with at least one dose of COVID-19 vaccine

The highest percentage of notified ADRs was found in the 0-49 year old group, followed by the groups of 50-79 years old and ≥ 80 years old, for both serious and non-serious ADRs (Table 3). The differences between age groups may be explained because younger adults are more prone to have ADRs than older individuals (e.g., due to a higher immunologic response) or because younger adults are more accustomed to reporting ADRs online.

A higher prevalence of ADRs with COVID-19 vaccines in younger recipients is also reported in official publications (10). In a study describing the characteristics of ADR reports following COVID-19 vaccination ($n = 8,976$) with the mRNA vaccines authorized by the Food and Drug Administration (FDA) in the USA, younger adults (18 to 64 years) reported more adverse events following COVID-19 vaccination compared to older adults, but the latter were more likely to report serious adverse events, such as death, permanent disability, and hospitalization (14 December 2020 to 22 January 2021) (11). A significant increased risk of side effects was identified in the younger age group (≤ 39 years old) with mRNA-based or viral vector-based vaccines (599 healthcare professionals) (15).

Gender

There were more suspected ADRs from COVID-19 vaccines in women (68.9%) than in men (23.1%), which follows the general ADR reporting profile for all medicinal products in Portugal, which may be explained by the following facts: women may give more attention to health issues than men (27-28) or women may be more prone to develop ADRs than men (13-14). It did not seem appropriate to identify possible differences between ADRs of COVID-19 vaccines per gender using only the present data, therefore additional clinical studies are recommended. These findings are aligned with the data from the EudraVigilance database on 5 September 2021: COVID-19 mRNA vaccine Spikevax (Moderna) (CX-024414) (74,306, 69.4% women; 31,782, 29.7% male; 972, 0.9% not specified; total 107,060, 100%); COVID-19 mRNA vaccine Comirnaty (Pfizer-BioNTech; Tozinameran) (290,099, 72.3% women; 105,137, 26.2% male; 6,264, 1.6% not specified; total 401,500, 100%); COVID-19 vaccine Vaxzevria (AstraZeneca) (ChAdOx1 nCoV-19) (263,671, 71.8% women; 94,407, 25.7% male; 9,046, 2.5% not specified; total 367,124, 100%); and COVID-19 vaccine Janssen (Janssen-Cilag) (AD26.

RAM notificadas por faixa etária e com pelo menos uma dose da vacina COVID-19

A maior percentagem de RAM verificou-se no grupo dos 0-49 anos, seguido pelos grupos de 50-79 anos e ≥ 80 anos, para ambos os tipos de RAM notificadas (graves ou não graves) (Tabela 3). As diferenças entre as faixas etárias podem ser explicadas porque os adultos mais jovens são mais propensos a ter RAM do que os idosos, por exemplo, devido a uma resposta imunológica superior ou habilitados/preparados para notificar RAM on-line.

Uma prevalência superior de RAM, em indivíduos mais jovens vacinados com vacinas COVID-19, também consta noutras publicações oficiais (10). Num estudo relativo às vacinas de mRNA autorizadas pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA ($n = 8.976$ participantes), os adultos mais jovens (18 a 64 anos) apresentaram mais RAM após a vacinação da COVID-19 em comparação com os adultos mais idosos. Ainda que os mais idosos tivessem sido mais propensos a manifestar RAM graves como morte, incapacidade permanente e hospitalização (14 dezembro 2020 a 22 janeiro 2021) (11). Num estudo com 599 profissionais de saúde, também se verificou um aumento significativo do risco de efeitos indesejáveis na faixa etária mais jovem (≤ 39 anos) com as vacinas de mRNA ou de vetor viral (15).

Género

Verificaram-se mais suspeitas de RAM de vacinas da COVID-19 em mulheres (68,9%) do que em homens (23,1%), o que segue o perfil geral de notificação de RAM para todos os produtos medicinais em Portugal. Esta situação pode ser explicada pelos seguintes factos: as mulheres parecem dar mais atenção aos problemas de saúde do que os homens (27-28) ou as mulheres podem ser mais propensas a desenvolver RAM do que os homens (13-14). Assim, apenas com base nos dados atuais, não se considerou apropriado identificar eventuais diferenças na prevalência de RAM por género relativamente às vacinas da COVID-19. São recomendados estudos clínicos adicionais. Os presentes resultados estão alinhados com os dados da base EudraVigilance (5 setembro 2021): vacina de mRNA COVID-19 Spikevax (Moderna) (CX-024414) (74.306, 69,4% mulheres; 31.782, 29,7% homens; 972, 0,9% não especificado; total 107.060, 100%); Vacina de mRNA COVID-19 Comirnaty (Pfizer-BioNTech; Tozinameran) (290.099, 72,3% mulheres; 105.137, 26,2% homens; 6.264, 1,6% não especificado; total 401.500, 100%); vacina COVID-19 AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19);

COV2.S) (15,415, 59.6% women; 10,107, 39.1% male; 328, 1.3% not specified; total 25,850, 100%) (31). Men may need to be motivated to more frequently report ADRs of COVID-19 vaccines in the EU, including Portugal.

Gender may be correlated with the prevalence of certain ADRs per COVID-19 vaccine. For instance, women may develop more ADRs than men, because they produce a higher immune response than men (11, 13, 15). In opposition to these findings, men were more likely to report serious adverse events, death, and hospitalization compared to women in a study with the two mRNA COVID-19 vaccines that received emergency authorization in the USA (14 December 2020 to 22 January 2021) (11). Thus, more studies are recommended regarding this topic (e.g., additional tailored clinical studies), namely sex and gender differences should be evaluated in the clinical trials of vaccines against COVID-19 (37).

Additionally, a questionnaire on ADRs may be provided to all subjects in the days following COVID-19 vaccination, or social studies may be implemented to better understand the differences between women and men on the profile of ADRs and the motivations to report ADRs. Preferably, these questionnaires should also be paper based, because some citizens have limited digital skills. A voluntary, smartphone-based safety surveillance system was developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) to provide information on adverse reactions after COVID-19 vaccination. The platform was effective, since voluntary reports to v-safe did not find unexpected patterns of adverse reactions after an additional dose of COVID-19 vaccine (n=12,591 participants). (38).

Administered vaccines and ADRs per vaccine type

The most administered vaccine in Portugal was Comirnaty (Pfizer-BioNTech), representing around 70% of all administered vaccines up to 22-7-2021 (27-28). A similar percentage was achieved in EU, with Comirnaty (Pfizer-BioNTech) representing 72% of all administered doses of COVID-2019 vaccines in EU up to 28 April 2021 (39). This similar profile/proportion of administration of Comirnaty may be justified by similar vaccination policies within the EU. Among other the EU Vaccines Strategy aims to “ensure the quality, safety and efficacy of vaccines”, “to secure timely access to vaccines for Member States and their population while leading the global solidarity effort”, “to ensure equitable and affordable access for all in the EU to an affordable vaccine as early as possible”,

vetor viral) (263.671, 71,8% mulheres; 94.407, 25,7% homens; 9.046, 2,5% não especificado; total 367.124, 100%); e a vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) (AD26.COV2.S; vetor viral) (15.415, 59,6% mulheres; 10.107, 39,1% homens; 328, 1,3% não especificado; total 25.850, 100%) (31). Deste modo, os homens podem ter de ser motivados para notificarem com mais frequência RAM das vacinas da COVID-19 na UE, incluindo em Portugal.

A prevalência de certas RAM por vacina da COVID-19 pode ser diferente entre homens e mulheres. Por exemplo, as mulheres podem desenvolver mais RAM do que os homens, porque produzem respostas imunes superiores às dos homens (11, 13, 15). Por oposição, num estudo com as duas vacinas COVID-19 de mRNA que receberam autorização de emergência nos EUA (14 dezembro 2020 a 22 janeiro 2021), os reações adversas graves, morte e hospitalização foram mais propensos em homens comparativamente às mulheres (11). Assim, são recomendados mais estudos sobre este tópico (p. ex., estudos clínicos), sendo que as diferenças de prevalência das RAM por grupo etário ou género devem ser consideradas/analizados nos ensaios clínicos das vacinas da COVID-19 (37).

Além disso, pode ser disponibilizado um questionário sobre RAM a todos os indivíduos nos dias seguintes à vacinação da COVID-19, ou podem eventualmente ser implementados estudos sociais para compreender melhor as diferenças entre as motivações dos homens e das mulheres no que concerne à notificação de RAM. Os questionários também devem ser fornecidos em suporte de papel, uma vez que alguns cidadãos têm habilidades/capacidades digitais limitadas. Por exemplo, um sistema voluntário de segurança das vacinas da COVID-19 foi desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), tendo por base uma plataforma digital em smartphones para fornecer informações sobre RAM após a vacinação. A plataforma foi eficaz, na medida em que as notificações voluntárias ao v-safe não encontraram padrões inesperados de reações adversas após uma dose adicional da vacina COVID-19 (n=12.591 participantes). (38).

Vacinas administradas e RAM por tipo de vacina

A Comirnaty (Pfizer-BioNTech) foi a vacina mais utilizada em Portugal, representando cerca de 70% de todas as vacinas administradas até 22 julho 2021 (27-28). Uma percentagem semelhante foi alcançada na UE, com a Comirnaty (Pfizer-BioNTech) representando 72% de todas as doses administradas de vacinas COVID-2019 até 28 abril 2021 (39). A semelhança

and “to make sure that preparations are made in EU countries regarding the roll-out of safe and effective vaccines, addressing transportation and deployment needs, and identifying priority groups.” Additionally, the European Commission decided to implement an advanced purchase agreements on COVID-19 vaccines and a centralized approach on procuring COVID-19 vaccines on behalf of the Member States (40).

Overall, Portugal had 1 only ADR per 1,000 administered vaccines from the 11,314 reported ADRs (100%) up to 22 July 2021 (27-28). On 30 September 2021, there were 1.2 reported ADRs per 1000 administered COVID-2019 vaccines in EU (41). These findings are indicative of a similar and low ADR reporting rate in Portugal and EU. In contrast, Australia comparatively registered 3.3 ADRs per 1,000 administered vaccines from the 50,597 reported ADRs (100%) up to 15 August 2021 (33). These differences may be due to a lower ADR reporting rate in Portugal/EU than in Australia, and/or the types of COVID-19 vaccines administered. In Portugal, Comirnaty (Pfizer-BioNTech), Spikevax (Moderna), Janssen COVID-19 Vaccine (Janssen-Cilag), and Vaxzevria (AstraZeneca) vaccines were administered. In Australia, Comirnaty (Pfizer-BioNTech) and Vaxzevria (AstraZeneca) vaccines were administered. COVID-19 vaccines ADRs may be under-reported to medicines agencies (42). Thus, post-vaccination surveys on vaccine efficacy and safety and more post-vaccination studies regarding safety and efficacy are recommended to all recipients. Post-vaccination surveys may be a more appropriate tool to monitor the safety of COVID-19 vaccines than the usual pharmacovigilance reporting systems. For instance, these questionnaires may be delivered by health authorities through national websites of vaccination certificates.

In the present study, Comirnaty (Pfizer-BioNTech), Spikevax (Moderna) (mRNA vaccines), and COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen-Cilag) (adenovirus vector vaccine) presented a similar number of notified ADRs per 1,000 administered vaccines, while Vaxzevria (AstraZeneca) (adenovirus vector vaccine) presented a slightly higher number of reported ADRs per 1,000 administered vaccines (27-28, 43). These findings are supported by other studies, with Vaxzevria (AstraZeneca)/AZD1222 presenting more reported ADRs than Comirnaty (Pfizer-BioNTech)/BNT162b2. Of 1,520 health workers, 80 received 2 doses of BNT162b2 vaccine and 1,440 received a first dose of AZD1222 vaccine: 52.5% and 76.2% of subjects

do perfil/proporção de vacinas de Comirnaty (Pfizer-BioNTech) administradas entre Portugal e a UE pode ser justificado pela adoção de políticas de vacinação semelhantes. Entre outros, a estratégia de vacinação da UE visa “garantir a qualidade, segurança e eficácia das vacinas”, “garantir o acesso oportuno às vacinas para os Estados-Membros e suas populações, liderando o esforço global de solidariedade”, “garantir o acesso equitativo e acessível a uma vacina para todos na UE, no mais curto espaço de tempo” e “garantir que as devidas diligências são tomadas nos países da UE em relação à distribuição de vacinas seguras e eficazes, tendo em conta as necessidades de transporte/distribuição e identificação de grupos prioritários”. Além disso, a Comissão Europeia estabeleceu acordos sofisticados de compra de vacinas da COVID-19 através de uma abordagem centralizada na aquisição destas vacinas em nome dos Estados-Membros (40).

Globalmente, Portugal registou apenas 1 RAM por cada 1.000 vacinas administradas das 11.314 RAM notificadas (100%) até 22 julho 2021 (27-28). Na UE, verificou-se 1,2 RAM por cada 1.000 vacinas COVID-2019 administradas em 30 setembro 2021 (41). Portugal e a UE apresentaram perfis semelhantes e baixos de RAM. No entanto, na Austrália a proporção foi comparativamente superior com 3,3 RAM por 1.000 vacinas administradas das 50.597 RAM notificadas (100%) até 15 agosto 2021 (33). Estas diferenças podem dever-se a uma menor notificação de RAM em Portugal/UE comparativamente à Austrália e/ou aos tipos de vacinas COVID-19 administradas em ambos os territórios: Portugal: Comirnaty (Pfizer-BioNTech), Spikevax (Moderna), vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) e Vaxzevria (AstraZeneca) vs. Austrália: Vacinas Comirnaty (Pfizer-BioNTech) e Vaxzevria (AstraZeneca). Como as RAM das vacinas da COVID-19 podem ser subnotificadas às agências do medicamento(42), são recomendadas mais investigações pós-vacinação sobre a eficácia e segurança das vacinas em todos os indivíduos vacinados. Questionários pós-vacinação podem constituir uma ferramenta mais adequada do que as habituais notificações utilizadas pelos sistemas de farmacovigilância para monitorizar a segurança das vacinas da COVID-19. Por exemplo, os sites nacionais dos certificados de vacinação podem ser utilizados para distribuir e administrar esses questionários.

No presente estudo, as vacinas: Comirnaty (Pfizer-BioNTech) e Spikevax (Moderna) (vacinas de mRNA) e vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) (vacina de vetor de adenovírus) apresentaram um número

reported adverse events after the first and second dose of BNT162b2, respectively, and 90.9% subjects reported adverse events after the first dose of AZD1222 ($p < 0.001$) (22).

In addition, in the EU up to 28 April 2021, the COVID-19 vaccines with more reported ADRs were Vaxzevria (0.67%; 184833 ADRs per 27430533 doses), followed by the Janssen COVID-19 vaccine (0.42%; 413 ADRs per 98139 doses), COVID-19 vaccine Spikevax (Moderna) (0.18%; 17625 ADRs per 9691295 doses), and Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (0.16%; 151306 ADRs per 96519666 doses) (27-28, 31, 39). The differences between the Portuguese and EU profiles of reported ADRs per vaccine type may be explained by the fact that ADR reporting in Portugal was based on 11,002,983 (100%) administered vaccines up to 22 July 2021, and ADRs reported in the EU were based on 133,739,633 (100%) administered vaccines up to 28 April 2021, i.e., findings based on the administration of a higher number of vaccines may be more sensitive. Moreover, cultural differences or the knowledge on how to report ADRs by country may explain the differences between the profiles of ADR reporting.

Globally, Vaxzevria (AstraZeneca) seems to be associated with a slightly higher number of ADRs (27-28, 39). Some citizens may have been more predisposed to report suspected ADRs related to Vaxzevria (AstraZeneca) or Janssen COVID-19 vaccine as a result of the occurrence of rare serious thrombotic events that were largely communicated by mass media and medicines agencies (44-46).

Study limitations

The causes of subjects' vaccination hesitancy and/or the psychosocial predictors of willingness to receive a COVID-19 vaccine were not specifically evaluated in the present study. However, on 22 October 2021 Portugal was the second most vaccinated country globally, which is demonstrative of a limited vaccination hesitancy in this territory (47). According to a study from the European Commission on the attitudes on vaccination against COVID-19 in the EU, Portugal achieved the highest rates on (believing) the benefits of the COVID-19 vaccine outweigh the risks (87%) and on the "civic duty" of vaccination (86%). Further,

semelhante de RAM notificadas (por 1.000 vacinas administradas), enquanto a Vaxzevria (AstraZeneca) (vacina de vetor de adenovírus) apresentou um número ligeiramente superior de RAM notificadas (por 1.000 vacinas administradas) (27-28, 43). Estes dados são apoiados por outros estudos, com a Vaxzevria (AstraZeneca)/AZD1222 a apresentar mais RAM do que a Comirnaty (Pfizer-BioNTech)/BNT162b2. De 1.520 profissionais de saúde, 80 receberam 2 doses da vacina BNT162b2 e 1.440 receberam uma primeira dose da vacina AZD1222: com 52,5% e 76,2% dos indivíduos com RAM após a primeira e segunda dose de BNT162b2, respetivamente e 90,9% dos indivíduos com RAM após a primeira dose de AZD1222 ($p < 0,001$) (22).

Além disso, na UE até 28 abril 2021, as vacinas COVID-19 com mais RAM notificadas foram a Vaxzevria (AstraZeneca) (0,67%; 184833 RAM por 27430533 doses), seguida pelas vacinas: da COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag) (0,42%; 413 RAM por 98139 doses), da Spikevax (Moderna) (0,18%; 17625 RAM por 9691295 doses) e da Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (0,16%; 151306 RAM por 96519666 doses) (27-28, 31, 39). As diferenças entre os perfis português e europeu de RAM notificadas por tipo de vacina podem ser explicadas porque as notificações de RAM em Portugal tiveram por base 11.002.983 (100%) vacinas administradas até 22 julho 2021 e as notificações de RAM na UE tiveram por base 133.739.633 (100%) vacinas administradas até 28 abril 2021, sendo que as análises baseadas num número superior de vacinas administradas podem ser mais sensíveis. Outros fatores, como diferenças culturais ou o conhecimento de como notificar RAM também podem contribuir para explicar discrepâncias entre os perfis de notificação de RAM entre diferentes países.

Globalmente, a Vaxzevria (AstraZeneca) parece estar relacionada com um número ligeiramente superior de RAM (27-28, 39). Alguns cidadãos, podem ter tido uma maior predisposição para notificar possíveis RAM relacionadas com as vacinas Vaxzevria (AstraZeneca) ou Jansen devido à ocorrência dos raros eventos trombóticos graves, que foram amplamente comunicadas pelos meios de comunicação social e agências do medicamento (44-46).

Limitações do estudo

No presente estudo não foram avaliados especificamente as causas da hesitação vacinal e/ou os preditores psicossociais da intenção de tomar a vacina da COVID-19. No entanto, em 22 outubro 2021, Portugal

the vast majority of Portuguese (82%) were satisfied with the management of the vaccination strategy by the Government and 89% agreed that the EU played a key role in ensuring access to COVID-19 vaccines in Portugal (48). Altogether, these findings may explain the low vaccine hesitancy regarding COVID-2019 vaccination in Portugal.

The self-reporting of ADRs by vaccinated citizens may be related to some inconsistencies/errors, since symptoms or health issues may be due to causes other than vaccination itself, or individuals may be psychologically worried by taking a COVID-19 vaccine and, consequently, motivated to report any symptom.

At least to some extent, younger subjects may have self-reported more ADRs because of their better proficiency regarding digital skills. Citizens with limited health literacy and fewer digital skills are more likely to experience more difficulties in reporting ADRs online. Self-reporting of ADRs per vaccine type may have been influenced/enhanced by some news of COVID-19 vaccines in social media (e.g., thrombotic events after Vaxzevria/AstraZeneca vaccination).

Conclusion

The benefits of COVID-19 vaccination far outweigh the potential risks of vaccination in Portugal (27-28, 33). Overall, the proportion of reported ADRs (serious and non-serious) was limited (1 ADR per 1,000 administered COVID-19 vaccines and 0.4 serious ADRs per 1,000 administered COVID-19 vaccines up to 22 July 2021), with a confirmed favourable vaccine safety profile (27-28). However, ADRs may have been under reported in Portugal, since higher self-reporting rates were comparatively reported in other countries (e.g., Australia) (33).

The reporting of suspected ADRs was mainly related to non-serious common reactions (e.g., swelling, fever, fatigue, chills, myalgia and pain at the administration site), which follows the normal patterns of reported ADRs in clinical trials, vaccines package leaflets, and/or vaccines ADR reports from other countries (33-35). These side effects usually resolved, without any consequence or hospitalization, in a few hours/days (27-28, 33, 39).

era o segundo país a nível mundial com maior taxa de vacinação, o que é demonstrativo de uma limitada hesitação vacinal neste território (47). De acordo com um estudo da Comissão Europeia sobre as atitudes relativamente à vacinação da COVID-19 na UE: Portugal obteve as taxas mais elevadas, nomeadamente com os benefícios da vacina da COVID-19 a superarem os riscos (87%) ou o “dever cívico” de vacinação (86%); a grande maioria dos portugueses (82%) ficou satisfeita com a gestão da estratégia de vacinação por parte do Governo e 89% concorda que a UE desempenhou um papel fundamental na garantia do acesso às vacinas da COVID-19 em Portugal (48). Em conjunto, estes resultados podem explicar a baixa hesitação vacinal em Portugal.

A auto-notificação de RAM, após a vacinação, por cidadãos pode estar relacionada com algumas inconsistências/erros, uma vez que os sintomas/problemas podem ser devido a outras causas que não a vacinação, ou os indivíduos podem estar de tal modo preocupados com a toma da vacina COVID-19, que podem ser induzidos a notificar qualquer sintoma.

Em certa medida os indivíduos mais jovens podem ter notificado mais RAM, devido a uma maior proficiência digital. Cidadãos com baixa literacia em saúde e menores habilidades digitais provavelmente terão mais dificuldades em comunicar RAM online. As notificações de RAM por tipo de vacina podem ter sido potenciadas por algumas notícias sobre as vacinas da COVID-19 nos meios de comunicação social (p.ex., o caso dos eventos trombóticos raros após a vacinação com a vacina da AstraZeneca).

Conclusão

Os benefícios da vacinação COVID-19 superaram em muito os riscos potenciais da vacinação em Portugal (27-28, 33). No geral, a proporção de RAM (graves e não graves) foi limitada (1 RAM por 1.000 vacinas COVID-19 administradas e 0,4 RAM graves por 1.000 vacinas COVID-19 administradas até 22 julho 2021), o que confirma um perfil de segurança favorável das vacinas COVID -19 em Portugal (27-28). No entanto, as RAM podem ter sido subnotificadas em Portugal, pois comparativamente noutros países (p.ex., Austrália) foram notificadas mais RAM (33).

A notificação de suspeita de RAM, relacionou-se principalmente com as reações comuns e consideradas não graves (p.ex., inchaço, febre, fadiga, calafrios,

The highest percentage of reported of notified ADRs was found in the youngest age group, which is in line with the findings of other studies (11-12, 15, 49). Further studies (e.g., clinical studies) are recommended to check these potential differences in incidence, prevalence, and type of ADR per gender or age group (e.g., profile of ADRs per age group) (37).

Of the four administered COVID-19 vaccines in Portugal: Vaxzervria (AstraZeneca), COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen-Cilag), Spikevax (Moderna), and Comirnaty (Pfizer-BioNTech) at the date of the present study, it seems that Vaxzervria (AstraZeneca) presents a slightly higher percentage of reported ADRs than the remaining vaccines. These data are supported by other studies and data from ADR databases (22, 31, 39). ADRs were more prevalent in women than men, which follows the general reporting tendency in Portugal and in the EU. This may be because women give more attention to health issues than men (27-28, 49). In this sense, men may need to be motivated to more regularly report ADRs.

Practical implications and future research

The exclusive use of self-reporting may not be the best method to monitor ADRs to COVID-19 vaccines, since subjects may underreport ADRs (e.g., lack of digital skills, lack of knowledge on how to report, or because the ADR is non-serious or the ADR is known or expected). In contrast, subjects may be influenced to report several kinds of ADRs (e.g., possible impact of social media news on the number and type of COVID-19 vaccines reporting of suspected ADRs). Overall, more studies are needed to confirm these suppositions, such as research to evaluate possible cultural differences on the profile and prevalence of self-reporting ADRs between different countries or the distribution of questionnaires regarding the occurrence of ADRs in the days after COVID-19 vaccination. The design and implementation of social studies (e.g., questionnaires) is highly recommended to better understand why certain populational groups (e.g., women) may self-report more ADRs of COVID-19 vaccines than other groups (e.g., men) or to minimise a possible under reporting of suspected ADRs.

mialgia) e dor no local de administração), o que segue os padrões normais das RAM identificadas em ensaios clínicos, nos folhetos informativos das vacinas e/ou em relatórios sobre a notificação de RAM de vacinas de outros países (33-35). Em geral, as RAM resolveram-se em poucas horas/dias, sem qualquer consequência/hospitalização (27-28, 33, 39).

A maior percentagem de RAM notificadas foi identificada nas faixas etárias mais jovem, o que está de acordo com dados de outros estudos (11-12, 15, 49). São recomendados estudos adicionais (p.ex., estudos clínicos) para verificar eventuais diferenças na incidência, prevalência e tipo de RAM por género ou faixa etária (p.ex., perfil de RAM por grupos etários) (37).

Das quatro vacinas COVID-19 administradas em Portugal: Vaxzervria (AstraZeneca), vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag), Spikevax (Moderna) e Comirnaty (Pfizer-BioNTech), à data do estudo, aparentemente a Vaxzervria (AstraZeneca) apresenta uma percentagem de RAM notificadas ligeiramente superior às restantes vacinas. Estes dados são apoiados por outros estudos e informações de bases dados de RAM (22, 31, 39). As RAM foram mais prevalentes em mulheres do que em homens, o que segue a tendência geral de notificação em Portugal e na UE. Isso pode ser porque as mulheres dão mais atenção às questões de saúde do que os homens (27-28, 49). Assim, os homens podem precisar de ser motivados a notificar RAM com mais regularidade.

Implicações práticas e estudos futuros

Apenas a auto-notificação da RAM pode não ser o melhor método para monitorizar RAM de vacinas COVID-19, atendendo à conhecida subnotificação de RAM (p.ex., falta de habilidades digitais, desconhecimento sobre como notificar ou por a RAM não ser grave ou já se encontrar descrita). Por outro lado, os indivíduos podem ser influenciados a notificar mais RAM em determinadas situações (p.ex., possível impacto das notícias da comunicação social no número e tipo de notificações de suspeitas de RAM de vacinas COVID-19). No geral, são necessárias mais investigações para confirmar essas suposições, nomeadamente recorrendo a estudos para avaliar o impacto das diferenças culturais no perfil e prevalência de RAM notificadas ou através da distribuição de questionários sobre a ocorrência de RAM nos dias seguintes à administração das vacinas COVID-19. O design e a implementação de estudos sociais (p.ex., com base em questionários) são recomendados para

Additionally, more clinical studies may be required to accurately study the profile of ADRs per COVID-19 vaccine or to determine possible links between age or gender and ADR profile, since subjects are required to regularly consult a healthcare professional and perform clinical analyses during clinical studies. The prevalence of side effects per type of ADR and/or vaccine should also be analyzed, for example, mRNA-based vaccines seem to be associated with a higher prevalence of local side effects (e.g., injection site pain), and viral vector-based vaccines seem to be associated with a higher prevalence of systemic adverse reactions (e.g., headache / fatigue) (15).

Authors Contributions Statement

The conceptualization, data analysis, writing (draft and original version), and review of the paper were carried out by Carla Pires. The author has read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

None.

Acknowledgements

The author acknowledges CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal.

Conflict of Interests

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

entender melhor as razões pelas quais certos grupos populacionais (p.ex., mulheres) tendem a notificar mais RAM de vacinas COVID-19 comparativamente a outros grupos (p.ex., homens) ou para minimizar uma eventual subnotificação de suspeitas de RAM.

Além disso, são recomendados mais estudos clínicos para estudar com precisão o perfil de RAM por vacina COVID-19 ou para determinar possíveis ligações entre idade ou género e o perfil de RAM, uma vez que é necessário consultar regularmente um profissional de saúde e realizar análises clínicas durante a participação em ensaios/estudos clínicos. A prevalência de RAM por tipo de vacina deve ser analisada. Por exemplo, vacinas baseadas em mRNA parecem estar associadas a uma maior prevalência de efeitos indesejáveis locais (p.ex., dor no local da injeção), ao passo que vacinas baseadas em vetores virais parecem estar associadas a uma maior prevalência de reações adversas sistémicas (p.ex., cefaleia / fadiga) (15).

Declaração sobre as contribuições do autor

A conceção, análise dos dados, redação (elaboração do rascunho e da versão original) e a revisão do artigo foram realizadas por Carla Pires. A autora leu e concordou com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento

Nenhum.

Agradecimentos

A autora expressa os seus agradecimentos a CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal.

Conflito de Interesses

A autora declara que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses (ou o que for aplicável).

References / Referências

- Carvalho, T., Krammer, F., & Iwasaki, A. (2021). The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nature reviews. Immunology*, 21, 245–256.
- Pormohammad, A., Zarei, M., Ghorbani, S., Mohammadi, M., Razizadeh, M.H., Turner, D.L., et al. (2021). Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Vaccines*, 9, 467.
- EMA. COVID-19 vaccines: authorized, 2021. Disponível online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorized#authorized-covid-19-vaccines-section> (Acedido em 5-9-2021).
- Francis, A. I., Ghany, S., Gilkes, T., & Umakanthan, S. (2021). Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Post-graduate medical journal*, 140654. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>.
- Liang, L. L., Kuo, H. S., Ho, H. J., & Wu, C. Y. (2021). COVID-19 vaccinations are associated with reduced fatality rates: Evidence from cross-county quasi-experiments. *Journal of global health*, 11, 05019.
- Padma, T.V. (2021). COVID vaccines to reach poorest countries in 2023 — despite recent pledges. *Nature*, 595, 342-343.
- Williams, J., Degeling, C., McVernon, J., & Dawson, A. (2021). How should we conduct pandemic vaccination? *Vaccine*, 39, 994–999.
- Frederiksen, L., Zhang, Y., Foged, C., & Thakur, A. (2020). The Long Road Toward COVID-19 Herd Immunity: Vaccine Platform Technologies and Mass Immunization Strategies. *Frontiers in immunology*, 11, 1817.
- Veldhoen, M., & Simas, J.P. (2021). Endemic SARS-CoV-2 will maintain post-pandemic immunity. *Nat Rev Immunol*, 21, 131–132.
- Medicines & Healthcare products Regulatory Agency. Research and analysis Coronavirus vaccine - weekly summary of Yellow Card reporting, Updated 7 October 2021. <https://www.gov.uk/government/publications/coronavirus-covid-19-vaccine-adverse-reactions/coronavirus-vaccine-summary-of-yellow-card-reporting>
- Xiong, X., Yuan, J., Li, M., Jiang, B., & Lu, Z.K. (2021). Age and Gender Disparities in Adverse Events Following COVID-19 Vaccination: Real-World Evidence Based on Big Data for Risk Management. *Frontiers in medicine*, 8, 700014.
- Abu-Hammad, O., Alduraidi, H., Abu-Hammad, S., Alnazzawi, A., Babkair, H., Abu-Hammad, A., et al. (2021). Side Effects Reported by Jordanian Healthcare Workers Who Received COVID-19 Vaccines. *Vaccines*, 9, 577.
- Migliore, L., Nicoli, V., & Stoccoro, A. (2021). Gender Specific Differences in Disease Susceptibility: The Role of Epigenetics. *Biomedicines*, 9, 652.
- Ciarambino, T., Barbagelata, E., Corbi, G., Ambrosino, I., Politi, C., Lavalle, F., Ruggieri, A., & Moretti, A. (2021). Gender differences in vaccine therapy: where are we in COVID-19 pandemic? *Monaldi archives for chest disease*. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2021.1669>.
- Klugar, M., Riad, A., Mekhemar, M., Conrad, J., Buchbender, M., Howaldt, H. P., et al. (2021). Side Effects of mRNA-Based and Viral Vector-Based COVID-19 Vaccines among German Healthcare Workers. *Biology*, 10, 752.
- Riad, A., Pokorná, A., Mekhemar, M., Conrad, J., Klugarová, J., Koščik, M., et al. (2021). Safety of ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine: Independent Evidence from Two EU States. *Vaccines*, 9, 673.
- Qutaiba A. Al Khames Aga, Waseem H., et al. (2021). Safety of COVID-19 vaccines. *J Med Virol.*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.27214>.
- Anand, P., & Stahel, V. P. (2021). Review the safety of Covid-19 mRNA vaccines: a review. *Patient safety in surgery*, 15, 20.
- Baden, L.R., El Sahly, H.M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., et al. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA–1273 SARS-CoV–2 Vaccine. *N Engl J Med.*, 384, 403–16.
- Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., et al. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid–19 Vaccine. *N Engl J Med.*, 383, 2603–15.
- Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A., Cárdenas, V., Shukarev, G., Grinsztejn, B., Spiessens, B., et al. (2021). ENSEMBLE Study Group Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med.*, 384, 2187–2201.
- Wi, Y.M., Kim, S.H., & Peck, K.R. (2021). Early Adverse Events between mRNA and Adenovirus-Vectored COVID-19 Vaccines in Healthcare Workers. *Vaccines*, 9, 931.
- Wu, Q., Dudley, M. Z., Chen, X., Bai, X., Dong, K., Zhuang, T., Salmon, & D Yu, H. (2021). Evaluation of the safety profile of COVID-19 vaccines: a rapid review. *BMC medicine*, 19, 173.
- HMA & EMA. (2017). Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP). Disponível online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-pharmacovigilance-practices-annex-i-definitions-rev-4_en.pdf (Acedido em 5-9-2021).
- FDA. (2018). Finding and Learning about Side Effects (adverse reactions). Disponível online: <https://www.fda.gov/drugs/information-consumers-and-patients-drugs/finding-and-learning-about-side-effects-adverse-reactions> (Acedido em 5-9-2021).
- WHO. (2020). COVID-19 Vaccines: Safety Surveillance Manual. Disponível online: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/Module_AEFI.pdf?ua=1 (Acedido em 4-9-2021).
- INFARMED, I.P. (2021). Pharmacovigilance Report – Monitorization of the safety of COVID-2019 vaccines [Relatório de Farmacovigilância Monitorização da segurança das vacinas contra a COVID-2019 em Portugal], received data until 22-7-2021. Disponível online: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/4562594 (Acedido em 4-9-2021).
- INFARMED, I.P. (2021). Pharmacovigilance Bulletin. 25(5). Disponível online: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/4230446/Boletim+de+Farmacovigil%C3%A2ncia%2C+Volume+25%2C+n%C2%BA5%2C+maio+de+2021/fb014726-c395-b78b-d75d-34c0c37939d5?version=1.0> (Acedido em 23-10-2021).
- Brüssow, H. (2021). COVID-19: vaccination problems. *Environmental microbiology*, 23, 2878–2890.
- EMA. (2014). Recommendation on harmonizing the approach to causality assessment for adverse events to veterinary medicinal products (revision 1). Disponível online: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/guidance/recommendation-harmonising-approach-causality-assessment-adverse-events-veterinary-medicinal> (Acedido em 12-9-2021).
- EMA. (2021). EudraVigilance: European database of suspected adverse drug reaction reports. Disponível online: <https://www.adrreports.eu/> (Acedido em 23-10-2021).
- INE – Instituto Nacional de Estatística. (2021). Censos 2021: resultados preliminares. Disponível online: https://ine.pt/scripts/db_censos_2021.html (Acedido em 5-9-2021).
- Therapeutic Goods Administration. (2021). COVID-19 vaccine weekly safety report - 19-08-2021. Disponível online: <https://www.tga.gov.au/periodic/covid-19-vaccine-weekly-safety-report-19-08-2021> (Acedido em 12-9-2021).
- Cai, C., Peng, Y., Shen, E., Huang, Q., Chen, Y., Liu, P, et al. (2021). A comprehensive analysis of the efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 29, 2794–2805.
- Yuan, P., Ai, P., Liu, Y., Ai, Z., Wang, Y., Cao, W., et al. (2020). Safety, Tolerability, and Immunogenicity of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *medRxiv: the preprint server for health sciences*, 2020.11.03.20224998. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.20224998>
- DGS – Direção Geral de Saúde. (2021). Portuguese COVID-2019 report on 4-9-2021. Disponível online: https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2021/09/551_DGS_boletim_20210904.pdf (Acedido em 5-9-2021).

37. Brady, E., Nielsen, M. W., Andersen, J. P., & Oertelt-Prigione, (2021). S. Lack of consideration of sex and gender in COVID-19 clinical studies. *Nature communications*, 12, 4015.
38. Hause, A. M., Baggs, J. Gee, J., Marquez, P., Myers, T. R., Shimabukuro, T. T., & Shay, D. K. (2021). Safety Monitoring of an Additional Dose of COVID-19 Vaccine - United States, August 12-September 19, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70, 1379–1384.
39. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). Suspected adverse reactions to COVID19 vaccination and the safety of substances of human origin, June 2021. Disponível online: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Suspected-adverse-reactions-to-COVID-19-vaccination-and-safety-of-SoHO.pdf> (Acedido em 23-10-2021).
40. European Commission. (2021). EU Vaccines Strategy, 2021. Disponível online: https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/public-health/eu-vaccines-strategy_en (Acedido em 23-10-2021).
41. European Medicine Agency. (2021). Safety of COVID-19 vaccines. Disponível online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/safety-covid-19-vaccines> (Acedido em 23-10-2021).
42. Ješkowiak, I., Wiatrak, B., Grosman-Dziewiszek, P., & Szeląg, (2021). A. The Incidence and Severity of Post-Vaccination Reactions after Vaccination against COVID-19. *Vaccines*, 9, 502.
43. WHO. (2021). Statement for healthcare professionals: How COVID-19 vaccines are regulated for safety and effectiveness, 11 June 2021. Disponível online: <https://www.who.int/news/item/11-06-2021-statement-for-healthcare-professionals-how-covid-19-vaccines-are-regulated-for-safety-and-effectiveness> (Acedido em 5-9-2021).
44. EMA. (2021). COVID-19 Vaccine Janssen: EMA finds possible link to very rare cases of unusual blood clots with low blood platelets, April 2021. Disponível online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-vaccine-janssen-ema-finds-possible-link-very-rare-cases-unusual-blood-clots-low-blood> (Acedido em 10-9-2021).
45. Thakur, K.T., Tamborska, A., Wood, G.K., McNeill, E., Roh, D., & Akpan, I.J., et al. (2021). Clinical review of cerebral venous thrombosis in the context of COVID-19 vaccinations: Evaluation, management, and scientific questions. *Journal of the neurological sciences*, 427, 117532.
46. Wise, J. (2021). Covid-19: European countries suspend use of Oxford-AstraZeneca vaccine after reports of blood clots. *BMJ (Clinical research ed.)*, 372, n699.
47. Our World in data. (2021). Statistics and Research: Coronavirus (COVID-19) Vaccinations, 2021. Disponível online: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations> (Acedido em 5-9-2021).
48. European Union. (2021). Attitudes on vaccination against Covid-19, June 2021. Disponível online: <https://europa.eu/eurobarometer/surveys/detail/2512> (Acedido em 24-10-2021).
49. Riad, A., Hocková, B., Kantorová, L., Slávik, R., Spurná, L., Stebel, A., Havřířak, M., & Klugar, M. (2021). Side Effects of mRNA-Based COVID-19 Vaccine: Nationwide Phase IV Study among Healthcare Workers in Slovakia. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14, 873.

Serious Adverse Reactions to COVID-19 vaccines in Portugal up to July 2021: thrombosis with thrombocytopenia syndrome, myocarditis/pericarditis, and Guillain-Barré syndrome

Reações adversas graves das vacinas COVID-19 em Portugal até julho de 2021: síndrome de trombose com trombocitopenia, miocardite/pericardite e síndrome de Guillain-Barré

Carla Pires

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

corresponding author / autora para correspondência: p5558@ulusofona.pt

Abstract

Serious adverse reactions to COVID-19 vaccines may be related to death or other serious clinical events. The aim of this study was to describe and to analyze the profile of serious notified Adverse Drug Reactions (ADRs) and the occurrence of some rare and serious adverse reactions to COVID-19 vaccines in Portugal up to 22 July 2021. Data was collected from public reports of INFARMED, I.P. (the Portuguese medicine agency). Up to 22 July 2021, there were 11,002,983 administered COVID-19 vaccines in Portugal, with 11,314 notified ADRs: 36% serious and 64% non-serious. Overall, 1 ADR and 0.4 serious ADRs were reported per each 1,000 administered vaccines, respectively. There were 2 confirmed cases of thrombosis with thrombocytopenia syndrome (TTS), 3 probable cases of Guillain-Barré syndrome (GBS), and 2 definitive cases of myocarditis/pericarditis, among the studied rare serious ADRs. In conclusion, as expected, rare cases of TTS, GBS and myocarditis/pericarditis were reported, which contribute to the maintenance of a safety profile of COVID-19 vaccines at national and international levels.

Keywords: COVID-19 vaccines; thrombosis with thrombocytopenia syndrome; Guillain-Barré syndrome; myocarditis; pericarditis

Resumo

As reações adversas graves a medicamentos (RAM) das vacinas COVID-19 podem estar relacionadas com morte ou outras situações clínicas graves. Objetivo do estudo: descrever e analisar o perfil de gravidade das Reações Adversas Medicamentosas (RAM) e a ocorrência de algumas RAM graves e raras das vacinas COVID-19 em Portugal até 22 de julho de 2021. Os dados foram recolhidos a partir de relatórios públicos do INFARMED, I.P. (agência portuguesa do medicamento). Até 22 de julho de 2021, foram administradas 11.002.983 vacinas contra a COVID-19 em Portugal, com 11.314 RAM notificadas: 36% graves e 64% não graves. Globalmente, foram reportadas 1 RAM e 0,4 RAM graves por cada 1.000 vacinas administradas, respetivamente. Entre as RAM graves, verificaram-se 2 casos confirmados de síndrome de trombose com trombocitopenia (TTS), 3 casos prováveis de síndrome de Guillain-Barré (SGB) e 2 casos definitivos de miocardite/pericardite. Em conclusão, como esperado, o número de casos notificados de TTS, SGB e miocardite/pericardite foram raros, o que suporta a manutenção do perfil de segurança das vacinas COVID-19 a nível nacional e internacional.

Palavras-chave: vacinas COVID-19; síndrome de trombose com trombocitopenia; síndrome de Guillain-Barré; miocardite; pericardite

Introduction

The World Health Organization (WHO) declared the COVID-19 pandemic on 11 March 2020, after the first description of 41 patients with a novel viral pneumonia in Wuhan, China on 24 January 2020 (1). The number of cases of COVID-19 reported to the WHO quickly increased. According to the WHO Coronavirus disease (COVID-19) Dashboard (8 April 2022), there have been 494,587,638 confirmed cases of COVID-19, including 6,170,283 deaths reported to the WHO, and a total of 11,250,782,214 vaccine doses have been administered globally (2). As of 10 March 2022, 3,380,263 people already have had COVID-19 in Portugal, with 21,285 (COVID-related) deaths since the beginning of the pandemic (3).

Impressively, COVID-19 vaccines were developed in a short timeframe since the beginning of the pandemic, with these medicinal products representing a determinant weapon in the mitigation of pandemic (4). Currently, there are five vaccines against COVID-19 authorized for use in the European Union (EU): Comirnaty (BioNTech and Pfizer); Nuvaxovid (Novavax), Spikevax (Moderna); Vaxzevria (previously COVID-19 Vaccine AstraZeneca), and COVID-19 vaccine Janssen (Janssen-Cilag International NV) (5). The safety and efficacy of COVID-19 vaccines are essential for their successful/rational use and for the mitigation of the pandemic (4, 6-7). Adverse drug reactions (ADRs) of COVID-19 vaccines or other medicinal products need to be closely monitored to prove there are no alterations in their safety profile and to maintain their approval status. Regulators are required to continuously demonstrate the effectiveness and safety profile of COVID-19 vaccines. The potential benefits of COVID-19 vaccines must outweigh the known risks (8).

Serious adverse events are incidents that may result in death, are life-threatening, require inpatient hospitalization or prolongation of existing hospitalization, result in persistent or significant disability/incapacity, or result in a congenital anomaly/birth defect (9-10). Any medical event that requires intervention to prevent one of the consequences of serious adverse events may also be considered as serious. However, adverse events following immunization of vaccines are predominantly categorized as non-serious: “an event that is not ‘serious’ and does not pose a potential risk to the health of the recipient” (9). Non-serious adverse events following immunization should also be carefully monitored because they may signal a potentially serious problem with the vaccine or

Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a pandemia de COVID-19 em 11 de março de 2020, após a primeira descrição de 41 doentes com uma nova pneumonia viral em Wuhan, China, em 24 de janeiro de 2020 (1). O número de casos de COVID-19 relatados à OMS aumentou rapidamente. De acordo com o painel de informações sobre a doença por coronavírus COVID-19 da OMS, em 8 de abril de 2022, tinham sido registados 494.587.638 casos confirmados de COVID-19, incluindo 6.170.283 mortes reportadas à OMS, com um total de 11.250.782.214 doses de vacina da COVID-19 administradas globalmente (2). A 10 de março de 2022 em Portugal, 3,380,263 pessoas tinham tido COVID-19, com 21.285 mortes relacionadas com esta doença desde o início da pandemia segundo os dados oficiais (3).

De um modo impressionante, as vacinas COVID-19 foram desenvolvidas num curto espaço de tempo desde o início da pandemia, sendo uma arma determinante na mitigação da pandemia (4). Atualmente, existem cinco vacinas contra a COVID-19 autorizadas na União Europeia (UE): Comirnaty (BioNTech e Pfizer); Nuvaxovid (Novavax), Spikevax (Moderna); Vaxzevria (anteriormente designada por Vacina COVID-19 AstraZeneca) e vacina COVID-19 Janssen (Janssen-Cilag International NV) (5). Além disso, a segurança e a eficácia das vacinas COVID-19 são essenciais para seu uso bem-sucedido/racional e para a mitigação da pandemia (4, 6-7). As reações adversas a medicamentos (RAM) de vacinas COVID-19 ou de outros medicamentos precisam ser monitorizadas de perto, para comprovar que não há alteração no seu perfil de segurança, bem como para manter seu status de aprovação. Os reguladores são obrigados a demonstrar continuamente a eficácia e o perfil de segurança das vacinas COVID-19. Os benefícios potenciais das vacinas contra a COVID-19 devem superar os seus riscos conhecidos (8).

As RAM graves são incidentes que resultam em morte, podem colocar a vida em risco, requerem internamento hospitalar ou prolongam a hospitalização, resultam em deficiência/incapacidade persistente ou resultam em anomalia congénita/defeito congénito (9-10). Qualquer evento médico que exija intervenção para prevenir as consequências de RAM graves, também pode ser considerado grave. No entanto, as reações adversas após imunização com vacinas são predominantemente categorizadas como não graves: “uma reação que não é ‘grave’ e que não representa um risco potencial para

vaccination or have an impact on the acceptability of the vaccination (9, 11). The fear of ADRs from COVID-19 vaccines is a relevant factor of subjects' vaccine hesitancy, which may contribute to compromise the achievement of herd immunity and, consequently, the mitigation of the COVID-19 pandemic. For instance, the provision of online, written, or oral information about the efficacy and safety (e.g., ADRs) of COVID-19 vaccines may contribute to promote adherence and reduce subjects' vaccine hesitancy (12). In Portugal, the share of vaccinated people against COVID-19 was 95% on 7 April 2022, which support very low rates of vaccine hesitancy at a national level. Portugal was the second country at a global level with the highest rate of vaccinated people, after United Arab Emirates (13).

In the EU as well as in the United States of America (USA), citizens may self-report adverse drug reactions (ADRs) online (14-15). However, ADRs have been underreported in some countries. For instance, a small number of post-vaccination adverse reactions were reported to the Sanitary Inspection of Poland in a study using a post-vaccination questionnaire (1,678 complete responses received) (14). The USA's Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) accepts reports from healthcare providers, vaccine manufacturers, and the public, in a similar manner as in the EU pharmacovigilance system (15).

During the first month of COVID-19 vaccine Safety Monitoring in the USA, 14 December 2020 – 13 January 2021, only 9.2% of reports were classified as serious with the Pfizer-BioNTech and Moderna vaccines. In this timeframe, there were 6,354 (90.8%) non-serious ADRs reports, and 113 (1.6%) deaths potentially related to these two vaccines, which support their favourable safety profile (15).

The serious adverse reactions to COVID-19 vaccines currently under safety monitoring in many countries are thrombosis with thrombocytopenia syndrome (TTS), myocarditis/pericarditis, and GBS, among others (16-17). As examples, the European Medicines Agency (EMA), the "Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P." (INFARMED, IP; Portugal), the Therapeutic Goods Administration (TGA; Australia) and the Food and Drug Administration (FDA; USA) are closely monitoring these ADRs (16-21). These three rare and serious ADRs were also identified as relevant by several other studies (22-23). Thus, a brief explanation on TTS, myocarditis/pericarditis and GBS is presented below.

a saúde de quem recebe a vacina" (9). As reações adversas não graves após a imunização também devem ser cuidadosamente monitorizados pois, podem indicar um problema potencialmente mais grave com a vacina ou com a vacinação ou ter impacto na aceitabilidade da vacinação (9, 11). O medo das RAM das vacinas COVID-19 é um relevante fator de hesitação vacinal. A hesitação vacinal pode contribuir para comprometer que se alcance a imunidade de grupo e, consequentemente, a mitigação da pandemia COVID-19. Por exemplo, a disponibilização de informações on-line, escritas ou orais sobre a eficácia e segurança (e.g. RAM) das vacinas COVID-19 pode favorecer a adesão à vacinação, reduzindo a hesitação vacinal dos indivíduos (12). Em Portugal, a percentagem de pessoas vacinadas contra a COVID-19 era de 95% em 7 de abril de 2022, o que é indicativo de níveis reduzidos de hesitação vacinal a nível nacional; Portugal é o segundo país a nível global com maior percentagem de pessoas vacinadas, depois dos Emirados Árabes Unidos (13).

Na UE e nos Estados Unidos da América (EUA), os cidadãos podem notificar RAM online (14-15). No entanto, verificou-se subnotificação de RAM em alguns Países. Por exemplo, um número reduzido de reações adversas pós-vacinação foi notificado à Inspeção Sanitária na Polónia, num estudo em que foi administrado um questionário pós-vacinação (1.678 respostas completas recebidas) (14). O sistema de vigilância dos EUA para reações adversas após a vacinação (VAERS) aceita notificações de profissionais de saúde, de fabricantes de vacinas e do público, o que também ocorre no sistema de farmacovigilância da UE (15).

Durante o primeiro mês da monitorização da segurança da vacina COVID-19 nos EUA, 14 de dezembro de 2020 a 13 de janeiro de 2021, apenas 9,2% das notificações foram classificadas como graves com as vacinas Pfizer-BioNTech e Moderna. Neste período, verificou-se que 6.354 (90,8%) das notificações de RAM foram classificadas como não graves, com 113 (1,6%) mortes eventualmente relacionadas com a administração destas duas vacinas. Estes dados parecem apoiar um perfil de segurança favorável destas duas vacinas (15).

Entre as reações adversas graves das vacinas COVID-19, que estão sob monitorização estão: a síndrome de trombose com trombocitopenia (TTS), a miocardite/pericardite e o síndrome de Guillain-Barré (SGB) (16-17). Por exemplo, a Agência Europeia do Medicamento (EMA), a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, IP; Portugal), a "Therapeutic Goods Administration" (TGA; Austrália)

Thrombosis with thrombocytopenia syndrome

TTS is characterized by thrombosis in atypical locations (with a predominance of cerebral venous thrombosis, splanchnic vein thrombosis, or arterial thrombosis) and serious thrombocytopenia, without previous exposure to heparin (16-17). TTS is a very rare (and potentially fatal) event following vaccination with Vaxzevria and the Janssen COVID-19 vaccine, which may occur up to 30 days after vaccination (16-17, 24). The pathophysiological mechanism of TTS occurrence is not fully known, although it is thought that TTS may be explained by a similar mechanism to the immune response occasionally seen in some patients treated with heparin, i.e., the autoimmune heparin-induced thrombocytopenia (aHIT) (16, 25).

As an example, 31 cases of cerebral venous sinus thrombosis out of approximately 2.2 million doses of COVID-19 Vaccine AstraZeneca were identified by the German Society of Thrombosis and Haemostasis (4–16 days post vaccination). However, concomitant thrombocytopenia was only reported in 19 patients, with 9 fatal cases (26-27). Diverse cases of thrombosis with thrombocytopenia, including cerebral venous thromboses (CVT) were reported in the months after subjects' immunization with adenovirus-vector COVID-19 vaccines ChAdOx1 nCoV-19 or COVID-19 Vaccine AstraZeneca, AZD1222 (Vaxzevria) and Ad26.COV2.S Janssen (Janssen-Cilag International NV) (28-30).

In addition to the recommended updates in the product information (e.g., package leaflet of medicines and summary of product characteristics, or SPC) for both Vaxzevria and the Janssen COVID-19 vaccine, healthcare professionals in the EU were informed of the signs and symptoms of TTS to facilitate its diagnosis and treatment as soon as possible, with the development and application of appropriate clinical guidelines (24).

ou a "Food and Drug Administration" (FDA; EUA) também estão a monitorizar de perto estas RAM (16-21). Além disso, estas três RAM raras e graves foram identificadas como relevantes em diversos outros estudos (22-23). Assim, a seguir apresenta-se uma breve explicação sobre a TTS, a miocardite/pericardite e o SGB.

Síndrome de trombose com trombocitopenia

A TTS é caracterizada por trombose em localizações atípicas (com predomínio de trombose venosa cerebral, trombose venosa esplâncnica ou trombose arterial) e trombocitopenia grave, sem exposição prévia à heparina (16-17). A TTS é uma reação adversa muito rara (e potencialmente fatal) após a vacinação com Vaxzevria ou com a vacina Janssen COVID-19, que pode ocorrer até 30 dias após a vacinação (16-17, 24). O mecanismo fisiopatológico da ocorrência da TTS não é totalmente conhecido, embora se pense que a TTS possa ser explicada por um mecanismo semelhante à resposta imune ocasionalmente observada em alguns doentes tratados com heparina, ou seja, a trombocitopenia autoimune induzida por heparina (aHIT) (16, 25).

Por exemplo, verificaram-se 31 casos de trombose venosa cerebral em aproximadamente 2,2 milhões de doses administradas da vacina AstraZeneca da COVID-19, que foram identificados pela Sociedade Alemã de Trombose e Hemostasia (4 a 16 dias após a vacinação). No entanto, a ocorrência de trombocitopenia concomitantemente foi apenas descrita em 19 doentes, sendo 9 casos fatais (26-27). Vários casos de trombose com trombocitopenia, incluindo trombose venosa cerebral (TVC) foram reportados nos últimos meses após a imunização dos indivíduos com vacinas de vetor de adenovírus COVID-19 ChAdOx1 nCoV-19 ou com a vacina AstraZeneca da COVID-19, AZD1222 (Vaxzevria) e Ad26.COV2.S Janssen (Janssen-Cilag International NV) (28-30).

Além das atualizações recomendadas nas informações de produto (e.g., folheto informativo dos medicamentos ou resumo das características do medicamento - RCM) para a Vaxzevria e para a vacina da COVID-19 da Janssen, os profissionais de saúde na UE foram informados sobre os sinais e sintomas da TTS para facilitar seu diagnóstico e tratamento com a maior brevidade possível, a par do desenvolvimento e aplicação de diretrizes clínicas apropriadas (24).

Myocarditis/pericarditis

Myocarditis and pericarditis are inflammatory conditions of the heart, which may lead to breathlessness, alterations in heartbeat (e.g., palpitations), and/or chest pain (31). Overall, COVID-19 vaccination reduces the relative risk of myocarditis and arrhythmia manifold (32). However, there is an association between myocarditis/pericarditis and COVID-19 mRNA vaccines in children and younger adults (with males affected approximately 5-10 times more often than females), which should be carefully monitored by healthcare professionals. With the second dose of mRNA vaccine, 12.6 cases of myocarditis/pericarditis per million were reported within 21 days of vaccination in individuals aged 12 to 39 years (33-35). In general, these types of cases tend to be mild (33).

The pathophysiological mechanism of the adverse reaction myocarditis/pericarditis is also not fully known. Different mechanisms have been proposed, such as, (i) the mRNA in the vaccine may be detected as an antigen by the immune system, which may promote the activation of pro-inflammatory cascades and immunological pathways in the heart; (ii) cross-reactions between antibodies directed to SARS-CoV-2 spike glycoproteins and structurally similar human protein sequences (e.g., myocardial α -myosin heavy chain); or (iii) testosterone may be associated with the inhibition of anti-inflammatory immune cells and promotion of more aggressive T helper 1 cell-type immune responses (36).

Both the EMA and FDA updated the Product Information for the mRNA vaccines (Comirnaty and Spikevax), regarding the risk of myocarditis/pericarditis as well as developed communication materials, with instructions/guidance following vaccination with mRNA COVID-19 vaccines (21, 31, 37).

Guillain-Barré syndrome

GBS is a serious and rare autoimmune disorder of the peripheral nervous system (the body's immune system attacks nerve cells), which typically develops within 4 weeks of an infection, such as influenza, cytomegalovirus, and glandular fever, or gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* bacteria (22, 38-39). Particularly, a possible causal relationship between the Janssen COVID-19 vaccine and GBS was communicated by the Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) of the EMA (20). As a pathophysiological mechanism, it has been hypothesized that an immune response following vaccination may

Miocardite/pericardite

A miocardite e a pericardite são condições inflamatórias do coração, que conduzem a falta de ar, alterações nos batimentos cardíacos (por exemplo, palpitações) e/ou dor no peito (31). No geral, a vacinação contra a COVID-19 reduz o risco relativo de miocardite e arritmia múltipla (32). No entanto, existe uma associação entre miocardite/pericardite e as vacinas de mRNA COVID-19 em crianças e adultos jovens (com os homens a serem aproximadamente 5-10 vezes mais afetados do que as mulheres), que deve ser cuidadosamente monitorizadas pelos profissionais de saúde. Com a segunda dose de vacina contra mRNA, foram notificados 12,6 casos de miocardite/pericardite por milhão no prazo de 21 dias após a vacinação em indivíduos com idades compreendidas entre os 12 e 39 anos (33-35). Em geral, este tipo de casos tende a ser ligeiro (33).

O mecanismo fisiopatológico da reação adversa miocardite/pericardite também não é totalmente conhecido. Entre os mecanismos propostos estão: (i) o mRNA da vacina pode ser detectado como um antígeno pelo sistema imunológico, o que pode promover a ativação de células pró-inflamatórias, cascatas e vias imunológicas no coração; (ii) reações cruzadas entre anticorpos direcionados a glicoproteínas *spike* do SARS-CoV-2 e sequências de proteínas humanas estruturalmente semelhantes (por exemplo, cadeia pesada de α -miosina do miocárdio); ou (iii) a testosterona pode estar associada à inibição de células imunes anti-inflamatórias e à promoção de respostas imunes do tipo célula T helper I mais agressivas (36).

Tanto a EMA e FDA atualizaram as Informações do Produto para as vacinas de mRNA (Comirnaty e Spikevax), sobre o risco de miocardite/pericardite, bem como foram desenvolvidos materiais de comunicação, com instruções/orientações após a vacinação com a vacina da COVID-19 de mRNA (21, 31, 37).

Síndrome de Guillain-Barré

A SGB é um problema de saúde autoimune grave e raro do sistema nervoso periférico (onde o sistema imunológico do corpo ataca as células nervosas), que normalmente se desenvolve dentro de 4 semanas após uma infecção, como a gripe, o citomegalovírus, a febre glandular, ou a gastroenterite causada pela bactéria *Campylobacter jejuni* (22, 38-39). Particularmente, o Comité de Avaliação de Risco de Farmacovigilância (PRAC) da EMA já veio comunicar uma possível relação causal entre a vacina COVID-19 da Janssen

produce an autoimmune process, which can lead to the production of autoantibodies against myelin (32)

Vaccination may indirectly contribute to reduce the risk of developing GBS, as vaccination decreases the risk of infectious diseases resulting from immunization. In one study, the onset of GBS after COVID-19 infection was reported for 36 patients, with a median interval of 11.5 days (22). However, a longer interval (24.2 days) was reported in another study (30 patient) (38). The number of cases of GBS after COVID-19 vaccination is rare (20, 22, 38).

Thus, the study aim was to describe and to analyze the profile of serious notified ADRs and the occurrence of some rare and serious adverse reactions to COVID-19 vaccines in Portugal up to 22 July 2021. Thus, the following research questions have been defined, as follows:

What was the profile of serious notified ADR?

- What was the ADR profile for Thrombosis with thrombocytopenia syndrome?
- What was the ADR profile for Guillain-Barré syndrome?
- What was the ADR profile for myocarditis/pericarditis?

Materials and Methods

Definition of ADR

ADRs are a “response to a medicinal product which is noxious and unintended” according to Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council (DIR 2001/83/EC Art 1(11)) (40-41). This definition is followed by INFARMED, I.P. and the EMA. The following synonyms of adverse reactions were used in the present study: adverse drug reaction (ADR) or adverse reaction.

Administered COVID-19 vaccines in Portugal and data sources

In July 2021, only four vaccines against COVID-19 were available in Portugal, specifically: Comirnaty, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) and Spikevax, mRNA-1273 (Moderna) (two mRNA-based vaccines), and Vaxzevria (AZD1222) and Janssen, Ad26.COV2.S (Janssen-Cilag). These vaccines were approved by the EMA through a centralized approval procedure and are used in the EU (5, 42).

e SGB (20). Como mecanismo fisiopatológico, foi levantada a hipótese de que uma resposta imune após a vacinação pode produzir um processo autoimune, que pode levar à produção de autoanticorpos contra a mielina (32).

A vacinação pode contribuir indiretamente para reduzir o risco de desenvolver SGB, pois a vacinação diminui o risco de doenças infecciosas decorrente da imunização. Num estudo, o aparecimento de SGB após a infeção de COVID-19 foi descrito em 36 doentes, com intervalos medianos de 11,5 dias (22). No entanto, um intervalo mais longo (24,2 dias) foi reportado num outro estudo, com 30 doentes (38). O número de casos de SGB após a vacinação com COVID-19 é raro (20, 22, 38).

Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever e analisar a gravidade das RAM e a ocorrência de algumas RAM graves e raras das vacinas COVID-19 em Portugal até 22 de julho de 2021. Foram definidas as seguintes questões de investigação, como a seguir se apresenta:

Qual foi o perfil das RAM notificadas graves?

- Qual foi o perfil de RAM para a síndrome de trombose com trombocitopenia?
- Qual foi o perfil de RAM para a síndrome de Guillain-Barré?
- Qual foi o perfil de RAM para a miocardite/pericardite?

Material e Métodos

Definições de RAM

As RAM são uma “resposta não intencional e nociva a um medicamento (DIR 2001/83/EC Art. 1(11))” (40-41). Esta definição é tida em conta pelo INFARMED, I.P. e EMA. No presente trabalho, foram utilizadas as seguintes designações: reação adversa ao medicamento (RAM) ou reação adversa.

Vacinas COVID-19 administradas em Portugal e fontes de dados

Em julho de 2021, apenas quatro vacinas estavam disponíveis contra a COVID-19 em Portugal: Comirnaty, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) e Spikevax, mRNA-1 COVID73 (Moderna) (duas vacinas em mRNA), e a Vaxzevria, AZ1222 (AZ1222 (AZ1222) e a Janssen, Ad26. COV2.S (Janssen-Cilag). Estas vacinas foram aprovadas por um procedimento centralizado da EMA, sendo usadas na UE (5, 42).

ADRs data potentially related to COVID-19 vaccines up to 22 July 2021 in Portugal were collected in two publications/reports from INFARMED, I.P. (the Portuguese medicine agency) (16-17). It should be noted that pediatric vaccination only began in Portugal on 18 December 2021 (43).

Self-reports of ADRs in Portugal

In Portugal, the reporting of suspected ADRs may be made online (<https://www.infarmed.pt/web/infarmed/portalam>) (44). Four elements are obligatory collected: the suspected ADR(s); the name(s) of likely related medicine(s); patient data (such as initials or age or sex); and the means of contact of the notifier of the ADR. Collected data are validated by experts (pharmacists and physicians) (44). These data are sent to two international databases of ADRs: the European (EudraVigilance) and worldwide WHO (VigiBase) ADR databases aiming at following the safety profile of medicines (45). Reports of ADRs may be carried out by a health professional and/or a citizen/patient, and if at least one ADR is classified as serious, the case is also classified as serious (9, 16-17).

Classification of serious ADRs

Serious ADRs were classified according to the WHO classification as follows: disability; hospitalization; congenital anomaly; life threatening, death or other (clinically relevant) (9, 16-17). This classification is also adopted by INFARMED, I.P. and the EMA (16-17, 46-47). ADRs are presented according to INFARMED, I.P. reports (9, 16-17).

Selected rare and serious ADRs: applied classification criteria

TTS, myocarditis/pericarditis, and GBS were purposely selected, since these three rare and serious ADRs are under close attention at both national and international levels according to the Pharmacovigilance report from INFARMED, I.P. on the monitorization of the safety of COVID-19 vaccines in Portugal up to 22 July 2021 (16-17).

Both the INFARMED, I.P. and the EMA follow the criteria of the Brighton Collaboration to classify TTS, myocarditis/pericarditis, and GBS (16-17, 48-

Os dados de todas as notificações de RAM potencialmente relacionadas com vacinas COVID-19 até 22 de julho de 2021 em Portugal foram recolhidos de 2 publicações/relatórios do INFARMED, I.P. (agência portuguesa de medicamentos) (16-17). De ressaltar, que a vacinação pediátrica só se iniciou em 18 de dezembro de 2021 em Portugal (43).

Auto-notificação de RAM em Portugal

Em Portugal, a notificação de suspeitas de RAM pode ser efetuada online (<https://www.infarmed.pt/web/infarmed/portalam>) (44). Quatro elementos são obrigatoriamente recolhidos: a(s) RAM(s) suspeita(s); o(s) nome(s) do(s) medicamento(s) provavelmente relacionado(s); dados do paciente (como iniciais ou idade ou sexo); e o meio de contato do notificador das RAM. Os dados recolhidos são validados por especialistas (farmacêuticos e médicos). Esses dados são enviados para duas bases internacionais de RAM: a base europeia EudraVigilance e a base mundial de RAM da OMS (VigiBase) com o objetivo de acompanhar o perfil de segurança dos medicamentos (45). A notificação de RAM pode ser realizada por um profissional de saúde e/ou um cidadão/doente, e se pelo menos uma RAM for classificada como grave, o caso também é classificado como grave (9, 16-17).

Classificação de RAM graves

As RAM graves foram designadas de acordo com a classificação da OMS como a seguir se apresenta: incapacidade; hospitalização; anomalia congénita; risco de vida, morte ou outro (cl clinicamente relevante) (9, 16-17). Esta classificação também é adotada pelo INFARMED, I.P. e EMA (16-17, 46-47). As RAM estão de acordo com as informações divulgadas nos relatórios do INFARMED, I.P. (9, 16-17).

RAM raras e graves selecionadas: critérios de classificação aplicados

A TTS, a miocardite/pericardite e a SGB foram propositadamente selecionadas, uma vez que estas três RAM raras e graves estão sob forte atenção a nível nacional e internacional de acordo com o relatório de Farmacovigilância do INFARMED, I.P. sobre a monitorização da segurança das vacinas COVID-19 em Portugal até 22 de julho de 2021 (16-17).

Tanto o INFARMED, I.P. como a EMA seguem os critérios da *Brighton Collaboration* para classificar TTS, miocardite/pericardite e SGB (16-17, 48-50). De acordo com esta classificação, um caso de TTS é

50). According to this classification, a case of TTS is classified as confirmed when the following cumulative factors occur: thrombosis in an atypical location; platelet count $<150 \times 10^9$ per L; D-Dimers $>4,000$ ng/mL; and anti-PF4+ antibodies. A case of TTS is classified as probable when the following cumulative factors occur: thrombosis in an atypical location; platelet count $<150 \times 10^9$ per L; and D-Dimers $>4,000$ ng/mL. A case of TTS is classified as possible when the following cumulative factors occur: thrombosis in an atypical location and platelet count $<150 \times 10^9$ per L (16-17, 48). Myocarditis/pericarditis were classified, as follows: level 1 (definitive), level 2 (probable), level 3 (possible), level 4, and level 5 (16-17, 49). Finally, GBS was classified in five levels according to Decision tree algorithm for GBS and Miller Fisher Syndromes Level of Diagnostic Certainty (Brighton collaboration case definition): level 1 (definitive), level 2 (probable), level 3 (possible), level 4, and level 5 (50).

Important remarks

The report of a certain suspected ADR does not necessarily presuppose the existence of a causal relationship between the reported adverse reaction and a certain medication, according to the information from diverse medicine agencies, such as the EMA or INFARMED, I.P. (16-17, 51-52).

Results and Discussion

Serious ADRs

From the 11,314 notified ADRs (100%), 36% (n = 4015) were classified as serious, while 64% were classified as not serious (16-17). Overall, more than 90% of all serious cases (n = 4,015) were related to temporary incapacity (e.g., absenteeism). Regarding the distribution of the serious notified ADRs, 9,6% (n = 1,087) were classified as “leading to disability”, and 0,6% as “may have led to death” (16-17). The distribution of serious notified ADRs according to WHO classification is presented in Table 1 (n) and Figure 1 (%).

classificado como confirmado quando ocorrem os seguintes fatores cumulativamente: trombose em local atípico; contagem de plaquetas $<150 \times 10^9$ por L; D-dímeros >4.000 ng/mL; e anticorpos anti-PF4+. Um caso de TTS é classificado como provável quando os seguintes fatores cumulativos ocorrem: trombose em uma localização atípica; contagem de plaquetas $<150 \times 10^9$ por L; e D-dímeros >4.000 ng/mL. Um caso de TTS é classificado como possível quando ocorrem os seguintes fatores cumulativos: trombose em local atípico e contagem de plaquetas $<150 \times 10^9$ por L) (16-17, 48). As miocardites/pericardites são classificadas de acordo com os seguintes níveis: nível 1 (definitivo), nível 2 (provável), nível 3 (possível), nível 4, e nível 5 (16-17, 49). Finalmente, de acordo com o algoritmo de árvore de decisão para SGB e Síndromes de Miller Fisher de Nível de Certeza Diagnóstica (definição de caso da *Brighton collaboration*), o SGB foi classificado em 5 níveis: nível 1 (definitivo); nível 2 (provável); nível 3 (possível); nível 4; e nível 5 (50).

Observações importantes

A notificação de uma determinada suspeita de RAM não pressupõe necessariamente a existência de uma relação causal entre a reação adversa notificada e um determinado medicamento de acordo com a informação de diversas agências de medicamentos, como a EMA ou o INFARMED, I.P. (16-17, 51-52).

Resultados e Discussão

RAM graves

Das 11.314 RAM notificadas (100%), 36% (n = 4015) foram classificadas como graves, enquanto 64% foram classificadas como não graves (16-17). No geral, mais de 90% de todos os casos graves (n = 4.015) estavam relacionados com incapacidades temporárias (por exemplo, absentismo no trabalho). No que concerne à distribuição das RAM notificadas graves, 9,6% (n = 1.087) foram classificadas como “incapacidade” e 0,6% (n = 68) foram classificadas como “podem ter conduzido à morte” (16-17). A distribuição das RAM graves notificadas de acordo com a classificação da OMS pode ser consultada na Tabela 1 (valores de n) e Figura 1 (%).

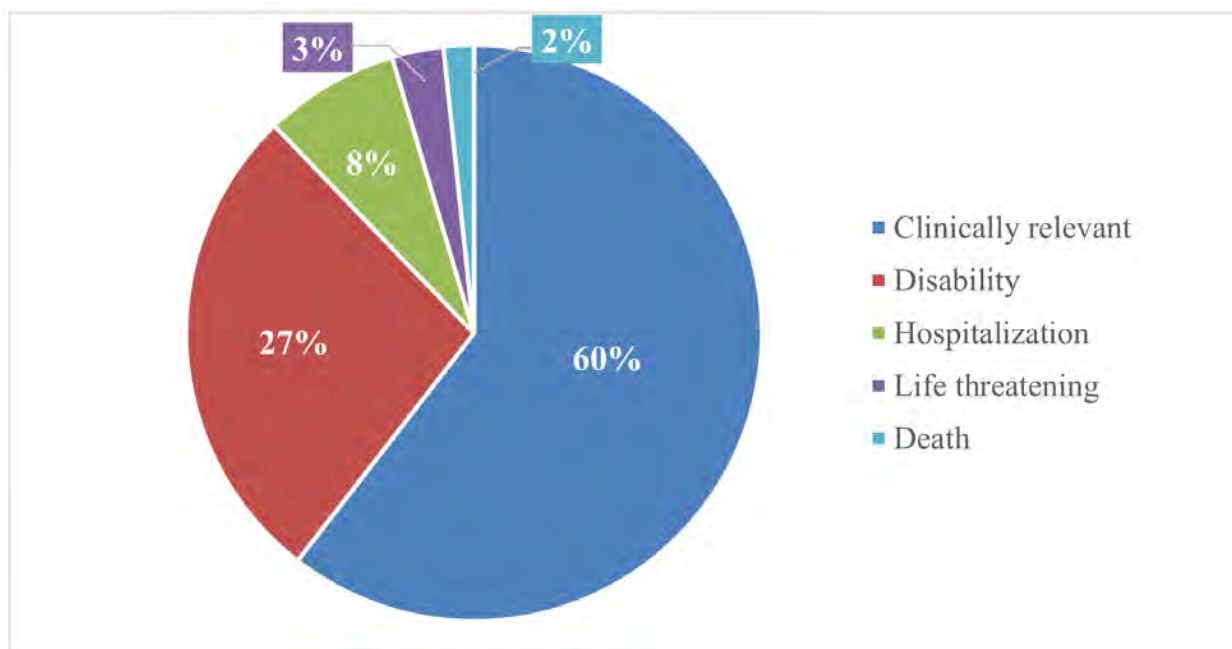


Figure 1 - Distribution of serious notified ADR per WHO classification in Portugal up to July 2021 (n=4015, 100%) (16-17).

Figura 1 - Distribuição de RAM notificadas graves por classificação da OMS em Portugal até julho de 2021 (n=4015, 100%) (16-17).

Table 1 - Distribution of serious notified ADR per WHO classification in Portugal up to July 2021 (n=4015, 100%) (16-17).

Tabela 1 - Distribuição de RAM notificadas graves por classificação da OMS em Portugal até julho de 2021 (n=4015, 100%) (16-17).

Serious notified ADR	N
Clinically relevant	2408
Disability	1087
Hospitalization	303
Congenital anomaly	0
Life threatening	116
Death	68

Reports associated with serious ADRs: TTS, GBS, and myocarditis/pericarditis

Thrombosis with thrombocytopenia syndrome

In Portugal, up to 22 July 2021 (cumulative number of all COVID-19 vaccines = 11,002,983), 7 cases of TTS were identified, all related with the vaccine Vaxzevria, as follows (16-17):

- Confirmed cases of TTS (n = 2);
- Probable cases of TTS (n = 2);
- Possible cases of TTS (n = 3).

Guillain-Barré syndrome

In Portugal, up to 22 July 2021 (cumulative number of all COVID-19 vaccines = 11,002,983), 13 cases of GBS potentially related to COVID-19 vaccination were identified: 11 cases of GBS potentially related to the vaccine Vaxzevria (3 cases from level 2 (probable) and 8 cases from level 4) and 2 cases of GBS with the Janssen vaccine (1 case from level 1 (definitive) and 1 case from level 4) (16-17).

Myocarditis/pericarditis

Overall, 9 cases of myocarditis/pericarditis were identified in Portugal up to 22 July 2021. All cases were related to Comirnaty and occurred in subjects who were more than 30 years of age (16-17).

Discussion

The discussion is organized in four sections: one section on severity and classification of ADRs and three sections on the studied serious and rare ADRs, respectively: TTS, GBS, and myocarditis/pericarditis. The reply to the four defined research questions is addressed and discussed in these sections.

Severity and classification of ADRs

Serious adverse events to COVID-19 vaccines are rare (i.e., may affect up to 1 in 1,000 people) (23, 53). Positively, only around one third from all reports of ADRs were classified as serious, and more than 90% from all serious cases were related to a situation of temporary incapacity, which support a favorable safety profile of COVID-19 vaccines in Portugal. ADRs

Notificações relacionadas com RAM graves: TTS, SGB e miocardite/pericardite

Síndrome de trombose com trombocitopenia

Em Portugal, até 22 de julho de 2021, o número acumulado de todas as vacinas contra a COVID-19 administradas era de 11.002.983, tendo sido identificados 7 casos de TTS, todos relacionados com a vacina Vaxzevria, como a seguir se descreve (16-17):

- Casos confirmados de TTS (n = 2);
- Casos prováveis de TTS (n = 2);
- Casos possíveis de TTS (n = 3).

Síndrome de Guillain-Barré

Em Portugal, até 22 de julho de 2021, o número acumulado de todas as vacinas contra a COVID-19 administradas foi de 11.002.983, tendo sido identificados 13 casos de SGB com a vacinação contra a COVID-19: 11 casos de SGB potencialmente relacionados com a vacina Vaxzevria (3 casos do nível 2 (prováveis) e 8 casos do nível 4) e 2 casos de SGB potencialmente relacionado com a vacina da Janssen (1 caso do nível 1 (definitivo) e 1 caso do nível 4) (16-17).

Miocardite/pericardite

Foram identificados 9 casos de miocardite/pericardite em Portugal até 22 julho de 2021. Todos os casos foram relacionados com a Comirnaty e ocorreram em indivíduos com mais de 30 anos de idade (16-17).

Discussão

A discussão encontra-se organizada em quatro seções: uma secção sobre a gravidade e classificação das RAM e três seções sobre as RAM graves e raras, respetivamente: TTS, SGB e miocardite/pericardite. A resposta às quatro questões de investigação definidas é abordada e discutida nestas seções.

Gravidade e classificação das RAM

As RAM graves das vacinas contra a COVID-19 são raras (i.e., podem afetar até 1 em 1.000 pessoas) (23, 53). Positivamente, no presente estudo, apenas cerca de um terço de todas as notificações de RAM foram classificadas como graves e mais de 90% de todos esses casos graves estavam relacionados a uma situação de incapacidade temporária, o que corrobora o perfil de segurança favorável das vacinas contra a COVID-19 em Portugal. Estes dados estão alinhados com o perfil

reports from the EU (EudraVigilance database) present a similar profile, with most cases of suspected ADRs being associated with non-serious adverse reactions (e.g., 'flu-like' illness, headache, pain at the application site, chills, fatigue, nausea, fever, dizziness, weakness, myalgia, and tachycardia) (38).

In Portugal, deaths after COVID-19 vaccination have occurred in subjects with a median age of 78 years. These deaths may not be directly related with the administration of these vaccines. For instance, fatalities may be explained by the natural patterns of morbidity or mortality of the Portuguese population (68 deaths per 11002983 administered vaccines in Portugal up to July 2021) (16-17). The reported deaths to the TGA after COVID-19 vaccination in Australia (810 reports of deaths received and reviewed in about 56.2 million administered doses of COVID-19 vaccines up to 31-3-2022) were proportionally higher than in Portugal. However, TGA only linked death to COVID-19 vaccination in 11 cases (people aged 34-81 years old) (18).

The percentage of reported deaths in the present study was also lower than the percentage reported in Gee *et al.* (2020) (15), *i.e.*, 0.6% vs. 1.6%, which may be explained by different populational characteristics or different percentages of self-reports. It is possible that some ADRs may have not been notified/reported by citizens in Portugal, for instance due to the lack of knowledge of some patients/citizens about how to report an ADR online. Further studies are recommended on the present topic, such as studies to characterize the social determinants related to self-reporting of ADRs or clinical studies to characterize the pathophysiological mechanism of serious and rare or potential fatal ADRs.

Reports related to serious and rare ADRs: TTS, GBS, and myocarditis/pericarditis

An adverse event after vaccination is defined as “any untoward medical event that follows immunization and that does not necessarily have a causal relationship with the usage of the vaccine” (9). Thus, adverse reactions to COVID-19 vaccines (serious and non-serious) must be closely monitored through self-reports, along with additional clinical and/or pharmacoepidemiologic studies (if necessary) to monitor their safety and efficacy profile.

de notificações na UE (base de dados EudraVigilance), verificando-se que a maioria das notificações de suspeitas de reações adversas relacionadas a RAM não graves foi apenas de carácter geral (por exemplo, sintomas 'semelhantes a uma gripe', dor de cabeça, dor no local da aplicação, calafrios, fadiga, náusea, febre, tontura, fraqueza, mialgia e taquicardia) (38).

Os casos fatais ocorreram em indivíduos com idade média de 78 anos e pode não ter estado diretamente relacionada com a administração da vacina. Estas fatalidades podem ser explicadas pelos padrões naturais de morbidade ou mortalidade da população portuguesa (68 mortes por 11002983 vacinas administradas em Portugal até julho de 2021) (16-17). As fatalidades notificadas à TGA após a vacinação da COVID-19 na Austrália (810 notificações de fatalidades recebidas e revistas em cerca de 56,2 milhões de doses administradas de vacinas da COVID-19 até 31-3-2022) foram proporcionalmente mais elevadas do que em Portugal. No entanto, a TGA apenas associou a morte à vacinação para COVID-19 em 11 casos (pessoas com idades entre 34 e 81 anos) (18).

A percentagem de óbitos descritos no presente estudo também foi inferior do que a percentagem relatada em Gee *et al.* (2020) (10), ou seja, 0,6% vs. 1,6%, o que pode ser explicado por diferentes características populacionais ou por diferentes percentagens de auto-notificações. É possível que nem todas as RAM sejam reportadas/notificadas pelos cidadãos em Portugal. Por exemplo, devido ao desconhecimento de alguns doentes/cidadãos sobre como notificar uma RAM online. Estudos adicionais sobre o presente tópico são recomendados, por exemplo, estudos para caracterizar os determinantes sociais relacionados com a auto-notificação de RAM ou estudos clínicos para caracterizar o mecanismo fisiopatológico de RAM graves e raras ou potencialmente fatais.

Notificações relacionadas com RAM raras e graves: TTS, SGB e miocardite/pericardite

Uma reação adversa após a vacinação é definida como “qualquer evento médico desfavorável que se segue à imunização e que não tem necessariamente uma relação causal com o uso da vacina” (9). Assim, as RAM das vacinas COVID-19 (graves e não graves) devem ser monitorizadas de perto por meio de auto-notificações, a par de estudos clínicos e estudos pharmacoepidemiológicos (se necessário) para supervisionar seu perfil de segurança e eficácia.

Additionally, it is expected that all EU member states follow the recommendations of the EMA, regarding the analysis/classification of the reports of ADRs such as TTS, GBS, and myocarditis/pericarditis. Reports of suspected ADRs are sent by medical agencies, such as INFARMED, I.P., to EudraVigilance database, which is “the system for managing and analyzing information on suspected adverse reactions to medicines which have been authorized or being studied in clinical trials in the European Economic Area (EEA). The EMA operates the system on behalf of the EU medicines regulatory network” (54-55). Thus, ADRs information of COVID-19 vaccines from EudraVigilance seem suitable to be compared between the member states of UE.

Thrombosis with thrombocytopenia syndrome

Diverse cases of thrombosis with thrombocytopenia, including cerebral venous thrombosis, were reported with both COVID-19 vaccines (Vaxzevria and Janssen) within the EU (56-59). For example, 11 cases of unusual thrombotic events in combination with thrombocytopenia were reported in Germany and Austria (March 2021); median age of 36 years; 9 out of 11 cases were women, and 6 of them died. These cases occurred 5-20 days after vaccination (60). Females seem to be affected more often by sinus vein thromboses associated with two of the vector-based vaccines (61). Similar clinical observations were reported for 5 cases in 130,000 vaccinated subjects in Norway (3 subjects died) (62). Particularly, up to 3 April 2022, 166 TTS (38 fatal) reports have been communicated to EudraVigilance database for Vaxzevria and 40 TTS (9 fatal) reports for Janssen vaccine, with 151,876,503 administered doses of Vaxzevria and 632,903,54 administered doses of Janssen vaccine in the EU on 7 April 2022 (54, 63).

As expected, the occurrence of TTS was very rare in Portugal: only 2 confirmed cases of TTS (all with Vaxzevria) per 11,002,983 administered COVID-19 vaccines (Vaxzevria, n = 1,141,821) up to 22 July 2021. The inexistence of confirmed cases of TTS associated with Janssen vaccines in Portugal up to July 2021 may be justified by the lower number of administered doses of this vaccine at a national level (i.e., 444,733) (16-17).

Adicionalmente, espera-se que todos os estados-membros da UE sigam as recomendações da EMA, no que diz respeito à análise/classificação das notificações de RAM, como trombose com TTS, SGS e miocardite/pericardite. As notificações de suspeitas de RAM são enviadas pelas agências de medicamentos, como o INFARMED, I.P. para a base de dados EudraVigilance, que é “o sistema de gestão e análise de informação sobre suspeitas de reações adversas a medicamentos autorizados ou em estudo em ensaios clínicos no Espaço Económico Europeu (EEE). A EMA opera o sistema em nome da rede reguladora de medicamentos da UE” (54-55). Assim, as informações de RAM de vacinas COVID-19 da EudraVigilance parecem adequados para serem comparadas entre os estados-membros da UE.

Síndrome de trombose com trombocitopenia

Com ambas as vacinas: Vaxzevria e Janssen registaram-se vários casos de síndrome de trombose com trombocitopenia, incluindo trombose venosa cerebral na UE (56-59). Por exemplo, 11 casos de reações adversas trombóticas incomuns em combinação com trombocitopenia foram reportados na Alemanha e na Áustria (março de 2021): 9 em 11 dos casos eram mulheres, das quais 6 morreram (idade mediana de 36 anos). Estes casos ocorreram 5-20 dias após a vacinação (60). As mulheres parecem ser mais frequentemente afetadas por trombose venosa cerebral, que pode ser associada às duas vacinas baseadas em vetores (61). Observações clínicas semelhantes verificaram-se entre 130.000 indivíduos vacinados na Noruega: morte de 3 indivíduos em 5 dos casos identificados (62). Particularmente, até 3 de abril de 2022, 166 notificações de TTS (38 fatais) foram comunicadas à base de dados EudraVigilance para a vacina COVID-19 Vaxzevria e 40 notificações de TTS (9 fatais) para a vacina Janssen, com 151.876.503 doses administradas da vacina COVID-19 Vaxzevria e 632.903.54 doses da vacina Janssen administradas na UE, em 7 de abril de 2022 (54, 63).

Como esperado, a TTS ocorreu muito raramente em Portugal: apenas 2 casos confirmados de TTS foram notificados (todos com Vaxzevria) em 11.002.983 vacinas contra a COVID-19 administradas (Vaxzevria, n = 1.141.821) até 22 de julho de 2021. A inexistência de casos confirmados de TTS associados às vacinas Janssen em Portugal até julho de 2021 pode ser justificada pelo menor número de doses administradas desta vacina a nível nacional (i.e., 444.733) (16-17).

Additionally, the TGA has evaluated the reports of TTS according to similar criteria to those applied in Portugal. These criteria respectively were, as follows: INFARMED, I.P.: thrombosis in an atypical location; platelet count $<150 \times 10^9$ per L; D-Dimers $>4,000$ ng/mL; and anti-PF4+ antibodies (16-17) vs. TGA: “patients with any site of new thrombosis who have recently received vaccination against COVID (day 4-20), should be further investigated for TTS”: (1) the platelet count is $<150 \times 10^9/L$ and either (2) D-dimers are elevated (5x ULN) or (3) fibrinogen is reduced, and either positive ELISA test for anti-PF4 antibodies and functional HIT testing (64). TGA have identified about 2 cases of TTS in every 100,000 vaccinated people with Vaxzevria (after the first dose). This risk significantly decreased after the second dose (i.e., 0.3 in every 100,000 vaccinated people) (18). TGA reports of TTS for Vaxzevria totaled 112 cases classified as possible or probable (62 confirmed, 50 probable) from approximately 8.1 million vaccine doses up to 19 August 2021 (39). The confirmed cases of TTS per million Vaxzevria doses administered are proportionally higher in Australia than Portugal, although classified as rare in both territories. Discrepancies between Portugal and Australia, regarding the number of confirmed cases of TTS may have been due to differences between subjects’ genetic susceptibility, morbidities, evaluation methodology, underreporting, or other. Further studies are recommended on this topic.

Guillain-Barré syndrome

A possible a causal relationship between COVID-19 vaccine Janssen and GBS was communicated by PRAC (20, 65). Regarding the reports of GBS in the EudraVigilance database, up to 3 April 2022, 1451 reports (22 fatal) of GBS for Vaxzevria (151.876.503 administered doses of Vaxzevria, 7 April 2022) and 474 reports (3 fatal) of GBS were reported for the Janssen vaccine (63.290.354 administered doses of the Janssen vaccine, 7 April 2022) (16-17, 54). It is important to notice that some of the reported cases may eventually be explained by the natural patterns of occurrence of GBS in the population (16-17, 54). Additionally, differences between the constitution of the two vaccines may explain variations between the report rates of GBS. For instance, Vaxzevria and Janssen adenovirus vectors present substantial differences (specimen origin): the Ad26.COVS vaccine uses a human Ad26-based vector, whereas the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine uses a chimpanzee adenovirus-based vector (58, 66).

Adicionalmente, a TGA avaliou as notificações de TTS de acordo com critérios semelhantes aos aplicados em Portugal. Esses critérios foram respetivamente: INFARMED, I.P.: trombose em local atípico; contagem de plaquetas $<150 \times 10^9$ por L; D-dímeros >4.000 ng/mL; e anticorpos anti-PF4+ (16-17) vs. TGA: “doentes que receberam recentemente vacinação contra COVID e com ocorrência de uma trombose em qualquer local (dia 4-20), devem ser investigados para TTS”: (1) a contagem de plaquetas $<150 \times 10^9/L$ e (2) os D-dímeros estão elevados (5x ULN) ou (3) o fibrinogénio está reduzido, e qualquer teste ELISA positivo para anticorpos anti-PF4 e teste HIT funcional (64). A TGA identificou cerca de 2 casos de TTS em cada 100.000 pessoas vacinadas com Vaxzevria (após a primeira dose). Este risco diminuiu significativamente após a segunda dose (i.e., 0,3 em cada 100.000 pessoas vacinadas) (18). De acordo com a TGA, as ocorrências TTS após a vacina Vaxzevria totalizaram 112 casos (62 confirmados, 50 prováveis) de aproximadamente 8,1 milhões de doses de vacina administradas até 19 de agosto de 2021 (39). A proporção de casos confirmados de TTS por milhão de doses administradas de Vaxzevria foi proporcionalmente superior na Austrália comparativamente a Portugal, sendo esta reação adversa classificada como rara em ambos os territórios. As discrepâncias entre Portugal e a Austrália relativamente ao número de casos confirmados de TTS podem ser explicadas: por diferenças na suscetibilidade genética dos sujeitos, no tipo de morbilidades, nas metodologias de avaliação aplicadas, por subnotificação ou outras. Deste modo, recomendam-se mais estudos sobre este tema.

Síndrome de Guillain-Barré

Uma possível relação causal entre a vacina COVID-19 Janssen e a ocorrência de SGB já foi comunicada pelo PRAC (20, 65). Em relação às notificações de SGB na base de dados EudraVigilance, até 3 de abril de 2022, 1451 notificações (22 fatais) de SGB com a Vaxzevria (151.876.503 doses administradas de Vaxzevria, 7 de abril de 2022) e 474 notificações (3 fatais) de SGB para a vacina Janssen (63.290.354 doses administradas de vacinas Janssen, 7 de abril de 2022) (16-17, 54). De ressaltar, que alguns dos casos relatados podem ser explicados pelos padrões naturais de ocorrência de SGB na população (16-17, 54). Adicionalmente, diferenças entre a constituição das duas vacinas podem eventualmente explicar variações entre as taxas de notificação de SGB para ambas as vacinas. Por exemplo, os vetores de adenovírus Vaxzevria e Janssen apresentam diferenças substanciais (origem do espécime): a vacina Ad26.COVS usa um vetor baseado em Ad26 humano,

In Portugal, the number of cases of GBS potentially related to the administration of a COVID-19 vaccine was higher for Vaxzevria (n = 11) (2,003,932 administered doses of Vaxzevria up to July 2021 in Portugal) than Janssen (n = 2) (444,733 administered doses of Janssen COVID-19 up to 22 July 2021) (16-17), which may be explained by the lower number of Janssen vaccines administered in Portugal up to 22 July 2021 or due to differences in the constitution of vaccines (as previously mentioned).

Overall, 310 preliminary reports of GBS were identified in VAERS (March 24, 2022), after the administration of more than 18.5 million J&J/Janssen COVID-19 vaccine doses in the USA (21). VAERS have not followed the Brighton collaboration criteria regarding the classification of GBS, because of the limited number of reported cases (13). TGA reported GBS in about one in every 100,000 people after vaccination with Vaxzevria, while Janssen vaccine was not being administered in Australia on 31-3-2022 (18). Additionally, on 9-4-2022, there was no published information in the official websites of TGA or the FDA supporting that these medicine agencies had followed the Brighton collaboration criteria to classify GBS reports. Proportionally, the reported cases of GBS in Portugal were also lower than in the USA and Australia, which eventually may be explained by underreporting of GBS after COVID-19 vaccination in Portugal, populational differences (e.g., genetic patterns, which can be associated with different susceptibilities), and/or discrepancies in the applied evaluation methodologies of ADRs.

According to the data from some regions, the number of reported cases of GBS have increased since the beginning of pandemic, with diverse reports of GBS after a COVID-19 infection (e.g., the rate per year was estimated to be 2.43/1,000,000 and 0.93/1,000,000 in 2020 and 2019, respectively, in northern Italy). On the other hand, COVID-19 vaccination may indirectly contribute to reduce the incidence of GBS, since immunization reduces the risk of infection (22, 38). For example, the risk of GBS after influenza infection or vaccination was evaluated in Ontario, Canada (1993 and 2011), with 1 GBS admission per million vaccinations being found in comparison to 17 GBS admissions per million cases of influenza (67).

enquanto a vacina ChAdOx1 nCoV-19 usa um vetor baseado em adenovírus de chimpanzé (58, 66).

Em Portugal, o número de casos de SGB potencialmente relacionados com a administração de uma vacina contra a COVID-19 foi superior com a Vaxzevria (n = 11) (2.003.932 doses de Vaxzevria administradas até julho de 2021 em Portugal) comparativamente à vacina da Janssen (n = 2) (444.733 doses administradas de Janssen COVID-19 até 22 de julho de 2021), o que pode ser explicado pelo número inferior de vacinas da Janssen administradas em Portugal até julho de 2021 ou devido a diferenças na constituição das vacinas (como já mencionado).

Foram identificados 310 casos preliminares de SGB no VAERS (24 de março de 2022), após a administração de mais de 18,5 milhões de doses da vacina J&J/Janssen COVID-19 nos EUA (21). Os critérios de colaboração de Brighton em relação à classificação do SGB não foram seguidos pelo VAERS, devido ao número limitado de casos relatados (13). A TGA identificou um caso de SGB em cada 100.000 pessoas após a vacinação com Vaxzevria, enquanto a vacina Janssen não estava a ser administrada na Austrália em 31-3-2022 (18). Além disso, em 04-09-2022, não havia informações publicadas nos sites oficiais da TGA ou FDA, em como estas agências do medicamento seguiram os critérios de colaboração de Brighton para classificar as notificações de SGB. Proporcionalmente, os casos notificados de SGB em Portugal também foram inferiores aos dos EUA e da Austrália, o que pode indicar uma eventual subnotificação de casos de SGB após a vacinação para COVID-19 em Portugal. Situação que eventualmente pode ser explicado por diferenças populacionais (por exemplo, padrões genéticos, que podem estar associados a diferentes suscetibilidades), e/ou discrepâncias nas metodologias de avaliação das RAM.

De acordo com os dados de algumas regiões, o número de casos notificados de SGB tem aumentado desde o início da pandemia, com diversas notificações de SGB após uma infecção por COVID-19 (por exemplo, a taxa por ano foi estimada em 2,43/1.000.000 e 0,93/1.000.000 em 2020 e 2019, respetivamente, no norte da Itália). Por outro lado, a vacinação contra COVID-19 pode contribuir indiretamente para reduzir a incidência de SGB, uma vez que a imunização reduz o risco de infecção (22, 38). Ou seja, as vacinas conferem proteção contra a doença COVID-19, o que provavelmente se relaciona com uma diminuição do número de casos de SGB (22-38). Por exemplo, o risco de SGB após infecção ou vacinação por gripe foi avaliado em Ontário, no Canadá (1993 e 2011), com 1 admissão por SGB por milhão de

PRAC has taken some regulatory actions on this topic, such as the recommendation that health professionals and vaccinated subjects (non-replicative viral vector vaccines) give special attention to the possible appearance of signs or symptoms of GBS. Particularly, the PRAC (meeting of 5-8 July 2021) recommended an update to the product information for Vaxzevria to include a warning to raise the awareness of healthcare professionals to report GBS cases following vaccination (16-17, 31). As well, GBS was listed and classified as a very rare side effect in the summary of product characteristics of the COVID-19 vaccine Janssen following PRAC recommendations (20).

Myocarditis/pericarditis

Myocarditis and pericarditis occur within 10 days after vaccination, particularly after the second dose of Comirnaty (Pfizer-BioNTech), and more often in younger men. Positively, these cardiac events are usually transient and resolve following rest, with only some patients requiring hospitalisation (39). According to the PRAC, *myocarditis and pericarditis can occur in very rare cases following vaccination with Comirnaty and Spikevax (previously Moderna COVID-19 vaccine)*. A detailed review by PRAC, including the data from EudraVigilance database respectively found 145 cases of myocarditis and 138 cases of pericarditis in the EEA among the recipients of the Comirnaty vaccine (among approximately 177 million doses of Comirnaty have been administered in EEA, 31 May 2021) and 19 cases of myocarditis and 19 cases of pericarditis in recipients of Spikevax (among approximately 20 million doses of Spikevax have been administered in EEA, 31 May 2021) (19).

TGA have classified as likely myocarditis: 36 cases level 1, 373 cases level 2, and 100 cases level 3 for Comirnaty (Pfizer) (38.4 million doses given) and 1 case level 1, 66 cases level 2, and 13 cases level 3 for Spikevax (Moderna) (4 million doses given) up to 27 March 2022. The applied criteria by TGA to classify the likely cases of myocarditis were, as follows: “cases classified as level 1 are confirmed to be myocarditis based on strong clinical evidence including the patient’s

vacinações em comparação com 17 admissões por SGB por milhão de casos de gripe (67).

O PRAC fez diversas recomendações regulamentares, nomeadamente que os profissionais de saúde e os indivíduos vacinados (vacinas de vetor viral não replicativo) tivessem uma especial atenção relativamente ao eventual aparecimento de sinais ou sintomas de SGB. Particularmente, o PRAC (reunião de 5 a 8 de julho de 2021) recomendou uma atualização das informações do produto para Vaxzevria, bem como pretendeu alertar/sensibilizar os profissionais de saúde a reportarem casos de SGB após a vacinação (16-17, 31). Além disso, a RAM SGB foi listada e classificada como muito rara no resumo das características do medicamento da vacina COVID-19 Janssen, de acordo com as recomendações do PRAC (20).

Miocardite/pericardite

A miocardite e a pericardite ocorreram até 10 dias após a vacinação, particularmente após a segunda dose de Comirnaty (Pfizer-BioNTech), e mais frequentemente em homens mais jovens. De um modo positivo, essas reações adversas cardíacas foram em geral transitórias e desaparecem após o repouso, com apenas alguns doentes a necessitar de tratamento hospitalar (39). De acordo com o PRAC, a miocardite e a pericardite podem ocorrer em casos muito raros após a vacinação com Comirnaty e Spikevax (anteriormente vacina COVID-19 Moderna). Numa análise detalhada do PRAC, incluindo os dados da base de dados EudraVigilance, respetivamente foram identificados: 145 casos de miocardite e 138 casos de pericardite no EEA entre pessoas que receberam Comirnaty (aproximadamente 177 milhões de doses de Comirnaty foram administradas no EEA, 31 maio de 2021) e 19 casos de miocardite e 19 casos de pericardite, entre pessoas que receberam Spikevax (aproximadamente 20 milhões de doses de Spikevax foram administradas no EEA, 31 de maio de 2021) (19).

A TGA classificou como casos prováveis de miocardite: 36 casos de nível 1, 373 casos de nível 2 e 100 casos de nível 3 para Comirnaty (Pfizer) (38,4 milhões de doses administradas) e 1 caso de nível 1, 66 casos de nível 2 e 13 casos de nível 3 para Spikevax (Moderna) (4 milhões de doses administradas) até 27 de março de 2022. A seguir apresentam-se os critérios aplicados pela TGA para classificar os casos prováveis de miocardite: “os casos classificados como nível 1 são confirmados como miocardite com base em fortes evidências clínicas, incluindo os sintomas do doente e os resultados de exames de imagem que indiquem

symptoms, and results of tests and imaging indicating a diagnosis of myocarditis. Level 2 cases are probably myocarditis based on a combination of symptoms and routine tests for heart conditions. Level 3 cases are possibly myocarditis based on symptoms and a doctor's report that myocarditis is the most likely diagnosis in the absence of medical tests and investigations. For all cases of suspected myocarditis, where possible, other known causes of the patient's symptoms or test results are ruled out before cases are classified" (18), i.e., the criteria of Brighton Collaboration to define myocarditis were not specifically followed by TGA.

Globally, the number of cases of myocarditis/pericarditis after COVID-19 vaccination in Portugal up to 22 July 2021 were proportionally lower than the number of reported cases in EEA and TGA, i.e., 8 cases of myocarditis/pericarditis (all with Comirnaty; 7 412 497 administered doses): 2 cases from level 1 - definitive; 1 case from level 2 - likely, and 2 cases from level 3 - possible (16-17). However, these findings are not directly comparable with other regions, which have not specifically followed the Brighton collaboration criteria in the classification of myocarditis/pericarditis (e.g., TGA in Australia). As well, these findings can indicate underreporting of ADRs by citizens and/or healthcare professionals in Portugal, populational differences (e.g., genetic profile or patterns of morbidity) and/or discrepancies in the applied evaluation methodologies of ADRs between regions.

Considering that PRAC has confirmed a possible association between the administration of mRNA vaccines and the appearance of myocarditis/pericarditis., the regulatory recommendations of PRAC were to list myocarditis and pericarditis as new adverse reactions in the product information (e.g., in the package leaflets of these vaccines) as well as to inform healthcare professionals and subjects on the present topic, for instance, to motivate them to report these ADRs (16-17, 31).

Practical implications and future research

Divulgations/campaigns on how to report ADRs in mass media and social networks can be useful to raise the awareness of the general public on the present topic, since reports of ADRs are fundamental to establish a causal relationship between ADRs and the administration of a certain medicine. The establishment of these causal relationships follow narrow scientific and regulatory criteria (e.g., generation and evaluation

o diagnóstico de miocardite. Os casos de nível 2 são classificados como sendo provavelmente miocardite, com base numa combinação de sintomas e exames de rotina para doenças cardíacas. Os casos de nível 3 são classificados com sendo possivelmente de miocardite, com base nos sintomas e no relatório de um médico, que indique que a miocardite é o diagnóstico mais provável (na ausência de exames e investigações médicas). Para todos os casos de suspeita de miocardite, sempre que possível, outras causas conhecidas dos sintomas do doente ou resultados de exames devem ser excluídos antes da classificação dos casos" (18), i.e., os critérios da *Brighton Collaboration* para definir miocardite não foram especificamente seguidos pela TGA.

Globalmente, o número de casos de miocardite/pericardite após vacinação contra a COVID-19 em Portugal até 22 de julho de 2021 foi proporcionalmente inferior ao número de casos notificados no EEA e TGA, ou seja, 8 casos de miocardite/pericardite (todos com Comirnaty; 7 412 497 doses administradas): 2 casos do nível 1 - definitivo; 1 caso do nível 2 - provável e 2 casos do nível 3 - possível (16-17). No entanto, estes dados não são diretamente comparáveis com outras regiões, que não tenham seguido especificamente os critérios de colaboração de Brighton na classificação de miocardite/pericardite (e.g., TGA na Austrália). Além disso, estes dados podem ser explicados por subnotificação de RAM por cidadãos e/ou profissionais de saúde em Portugal, ou diferenças populacionais (e.g., características genéticas ou padrões de morbidade) e/ou discrepâncias nas metodologias de avaliação de RAM entre regiões.

Tendo em conta que o PRAC confirmou uma possível associação entre a administração de vacinas de mRNA e o aparecimento de miocardite/pericardite, as recomendações regulamentares do PRAC passaram por listar a miocardite e a pericardite como novas reações adversas nos materiais informativos destes produtos (e.g., no folheto informativo). Além disso, verificou-se uma divulgação desta informação junto dos profissionais de saúde e dos indivíduos que tomam essas vacinas, por exemplo, para os motivar a notificar estas RAM (16-17, 31).

Implicações práticas e proposta de investigações futuras

Divulgações/campanhas nos meios de comunicação de social e nas redes sociais sobre como notificar RAM, podem ser úteis para aumentar a consciencialização do público sobre este tópico, uma vez que as notificações de reações adversas são fundamentais para estabelecer uma

of signs, i.e., in pharmacovigilance a signal is defined as “information arising from one or multiple sources, including observations and experiments, which suggests a new potentially causal association, or a new aspect of a known association between an intervention and an event or set of related events, either adverse or beneficial, that is judged to be of sufficient likelihood to justify verificatory action”) (16-17). ADRs (serious and non-serious) should be narrowly and continually monitored to detect any possible modification in the patterns of ADRs at a global level.

Additionally, complementary pharmacoepidemiologic and clinical studies with a rigorous scientific design can be recommended to monitor the safety profile of COVID-19 vaccines (68), although complementary clinical studies are only proposed in situations that clearly need explanation. For instance, if the methods described above are insufficient to establish a potential association between the exposure to a particular medicine and a certain adverse reaction (69). Findings from these studies may be especially relevant to the implementation of political and public health measures (e.g., to accurately select the safest vaccines against COVID-19 in a certain region) and/or to monitor the safety of COVID-19 vaccines in the long term.

Study limitations

Comparisons of the profile of ADRs between different countries are not possible, as equivalent evaluation methodologies of ADRs may have not been followed (e.g., Brighton collaboration criteria were not specifically followed in all regions/countries). Additionally, clinical data from individual reported cases are not public (e.g., in the pharmacovigilance reports/bulletins), which necessarily limited the analyses/comparisons provided.

relação causal entre uma determinada reação adversa e a toma de um medicamento. O estabelecimento de uma relação causal entre as RAM e a administração de um determinado medicamento deve seguir critérios científicos e regulamentares rigorosos (e.g. geração e avaliação de sinais, sendo que se entende como sinal em farmacovigilância, qualquer “informação proveniente de diversas fontes, incluindo dados observacionais e experimentais, que possa sugerir uma nova potencial associação causal ou um novo aspecto de uma associação conhecida (e.g., uma alteração da frequência de ocorrência) entre uma intervenção e um acontecimento, benéfico ou adverso, cujo grau de probabilidade se considera suficiente para justificar uma ação de verificação (estudo adicional)”) (16-17). RAM (graves e não graves) devem ser estreitamente monitorizadas para detetar qualquer possível modificação nos padrões de RAM a nível global.

Adicionalmente, estudos clínicos e pharmacoepidemiológicos complementares apenas são propostos em situações que claramente necessitem de esclarecimentos adicionais, por exemplo, se os métodos anteriormente descritos forem insuficientes para estabelecer uma potencial associação entre a exposição a um determinado fármaco e a reação adversa (69). Os resultados desses estudos podem ser especialmente relevantes para a implementação de medidas políticas e de saúde pública (por exemplo, para selecionar com precisão as vacinas mais seguras contra COVID-19 numa determinada região) e/ou para acompanhar no longo prazo a segurança das vacinas COVID-19.

Limitações do estudo

Tendo em conta que as metodologias de avaliação de RAM nem sempre foram iguais (por exemplo, os critérios de colaboração de Brighton não foram seguidos especificamente em todas as regiões/países), a comparação do perfil de RAM entre países pode não ser possível. Além disso, os dados clínicos dos casos individuais notificados não são públicos (e.g., nos relatórios/boletins de farmacovigilância), o que necessariamente limita as análises/comparações.

Conclusion

In general, the proportion of reported ADRs (serious and non-serious) was low (1 ADR and 0.4 serious ADRs per 1,000 administered COVID-19 vaccines) in Portugal up to 22 July 2021 (16-17). These findings support the maintenance of a favorable safety profile of COVID-19 vaccines at a national and international level.

The report of suspected adverse reactions *per se* is not enough to determine the likelihood of a certain adverse reaction and/or to prove/confirm a potential link between the medicine/vaccine and the observed adverse reaction (51-52). For instance, the occurrence of deaths or other serious reported ADRs may be explained by the normal patterns of mortality and/or morbidity rates of populations.

As expected, the reports of potentially serious ADRs after COVID-19 vaccination, namely TTS, GBS, and/or myocarditis/pericarditis were very rare at national and international levels. These three ADRs may have been underreported in Portugal in comparison to other countries, such as Australia or the USA. However, these differences may be explained by differences between populations and/or the application of different methodological approaches to evaluate ADRs.

Authors Contributions Statement

This work was fully carried out by Carla Pires (conceptualization, drafting, data analysis, and reviewing).

Funding

None.

Acknowledgements

Not applicable.

Conflict of Interests

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

Conclusão

Em geral, a proporção de RAM notificadas (graves e não graves) foi pouco frequente (1 RAM por 1.000 vacinas COVID-19 administradas e 0,4 RAM graves por 1.000 vacinas COVID-19 administradas) em Portugal até 22 de julho de 2021 (16-17). Estes resultados suportam a manutenção de um perfil de segurança favorável das vacinas contra a COVID-19 a nível nacional e internacional.

A notificação de suspeita de RAM por si só não é suficiente para determinar a probabilidade de uma determinada reação adversa e/ou para provar/confirmar uma potencial ligação entre o medicamento/vacina e a reação adversa observada (51-52). Por exemplo, a ocorrência de fatalidades ou outras RAM graves notificadas pode ser explicada pelos padrões normais de mortalidade e/ou de morbilidade das populações.

Como esperado, as notificações de RAM potencialmente graves após a vacinação contra a COVID-19, nomeadamente TTS, SGB e/ou miocardite/pericardite foram muito raras a nível nacional e internacional. Estas três RAM podem ter sido subnotificadas em Portugal, por exemplo, em comparação com outros países, como Austrália ou os EUA. Ainda que, essas diferenças podem eventualmente ser explicadas por diferenças entre populações e/ou pela aplicação de diferentes abordagens metodológicas para avaliar as RAM.

Declaração sobre as contribuições do autor

Este trabalho foi totalmente concretizado por Carla Pires (desenho do estudo, redação, análise de dados e revisão).

Financiamento

Nenhum.

Agradecimentos

Não aplicável

Conflito de Interesses

A autora declara que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses (ou o que for aplicável).

References / Referências

1. Cucinotta, D., & Vanelli, M. (2020). WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 91(1), 157–160. <https://doi.org/10.23750/abm.v9i1.9397>
2. WHO. (2022). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 9-4-2022)
3. DGS – Direção Geral de Saúde. (2022). Portuguese COVID-19 report on 3-2-2022. Available online: <https://covid19.min-saude.pt/relatorio-de-situacao/> (accessed on 30-4-2022).
4. Carvalho, T., Krammer, F., & Iwasaki, A. (2021). The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nature reviews. Immunology*, 21, 245–256.
5. EMA. (2021). COVID-19 vaccines: authorized, 2021. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorized#authorized-covid-19-vaccines-section> (accessed on 5-9-2021).
6. Williams, J., Degeling, C., McVernon, J., & Dawson, A. (2021). How should we conduct pandemic vaccination? *Vaccine*, 39, 994–999.
7. Frederiksen, L., Zhang, Y., Foged, C., & Thakur, A. (2020). The Long Road Toward COVID-19 Herd Immunity: Vaccine Platform Technologies and Mass Immunization Strategies. *Frontiers in immunology*, 11, 1817.
8. WHO. (2021). Statement for healthcare professionals: How COVID-19 vaccines are regulated for safety and effectiveness, 11 June 2021. Available online: <https://www.who.int/news/item/11-06-2021-statement-for-healthcare-professionals-how-covid-19-vaccines-are-regulated-for-safety-and-effectiveness> (accessed on 5-9-2021).
9. WHO. (2020). COVID-19 vaccines: Safety Surveillance Manual, 2020. Available online: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/Module_AEFI.pdf?ua=1 (accessed on 4-9-2021).
10. FDA. (2021). What is a Serious Adverse Event? Available online: <https://www.fda.gov/safety/reporting-serious-problems-fda/what-serious-adverse-event> (accessed on 3-4-2021).
11. NSW government. (2021). Adverse Event Following Immunisation control guideline. Available online: <https://www.health.nsw.gov.au/Infectious/controlguideline/Pages/adverse.aspx> (accessed on 4-4-2021).
12. Pires C. (2021). What Is the State-of-the-Art in Clinical Trials on Vaccine Hesitancy 2015-2020? *Vaccines*, 9, 348.
13. Our world in data. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Available online: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations> (accessed 9-4-2022).
14. Jęskowiak, I., Wiatrak, B., Grosman-Dziewiszek, P., & Szelaż, (2021). A. The Incidence and Severity of Post-Vaccination Reactions after Vaccination against COVID-19. *Vaccines*, 9, 502.
15. Gee, J., Marquez, P., Su, J., et al. (2021). First Month of COVID-19 vaccine Safety Monitoring — United States, December 14, 2020–January 13, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 70:283–288.
16. INFARMED, I.P. (2021). Pharmacovigilance Report – Monitorization of the safety of COVID-19 vaccines up to 22-7-2022. [Relatório de Farmacovigilância Monitorização da segurança das vacinas contra a COVID-19 em Portugal up to 22-7-2021].
17. INFARMED, I.P. (2021). Pharmacovigilance Bulletin: monitorization of the safety of COVID-19 vaccines up to 22-7-2021. [Monitorização da segurança das vacinas contra a COVID-19 em Portugal até 22-7-2021]. V. 25, Number 5, 2021. Available online: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/4230446/Boletim+de+Farmacovigil%C3%A2ncia%2C+Volume+25%2C+n%C2%BA5%2C+maio+de+2021/fb014726-c395-b78b-d75d-34c0c37939d5?version=1.0> (accessed on 23-10-2021).
18. TGA. (2022). COVID-19 vaccine weekly safety report - 31-03-2022. Available online: <https://www.tga.gov.au/periodic/covid-19-vaccine-weekly-safety-report-31-03-2022> (accessed on 6-4-2022).
19. EMA. (2021). Comirnaty and Spikevax: possible link to very rare cases of myocarditis and pericarditis. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/comirnaty-spikevax-possible-link-very-rare-cases-myocarditis-pericarditis> (accessed on 6-4-2022).
20. EMA. (2021). COVID-19 vaccine Janssen: Guillain-Barré syndrome listed as a very rare side effect. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-vaccine-janssen-guillain-barre-syndrome-listed-very-rare-side-effect> (accessed on 3-4-2021).
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). Selected Adverse Events Reported after COVID-19 Vaccination. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/safety/adverse-events.html> (accessed on 3-4-2021).
22. Uncini, A., Vallat, J.M., & Jacobs, B.C. (2020). Guillain-Barre´ syndrome in SARS-CoV-2 infection: an instant systematic review of the first six months of pandemic. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 91, 1105–10.
23. Wu, Q., Dudley, M. Z., Chen, X., Bai, X., Dong, K., Zhuang, T., Salmon, & D Yu, H. (2021). Evaluation of the safety profile of COVID-19 vaccines: a rapid review. *BMC medicine*, 19, 173.
24. EMA’s COVID-19 taskforce. (2021). EMA raises awareness of clinical care recommendations to manage suspected thrombosis with thrombocytopenia syndrome, June 2021. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-raises-awareness-clinical-care-recommendations-manage-suspected-thrombosis-thrombocytopenia> (accessed on 11-9-2021).
25. WHO. (2021). Guidance for clinical case management of thrombosis with thrombocytopenia syndrome (TTS) following vaccination to prevent coronavirus disease (COVID-19). Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/342999/WHO-2019-nCoV-TTS-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed on 3-4-2021).
26. Alam, W. (2021). COVID-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia: A review of the potential mechanisms and proposed management. *Science progress*, 104, 368504211025927.
27. Oldenburg, J., Klamroth, R., Langer, F., et al. (2021). Diagnosis and management of vaccine related thrombosis following AstraZeneca COVID-19 vaccination: guidance statement from the GTH. *Hamostaseologie*, 41, 184–189.
28. EMA. (2021). COVID-19 vaccine Janssen: EMA finds possible link to very rare cases of unusual blood clots with low blood platelets, April 2021. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-vaccine-janssen-ema-finds-possible-link-very-rare-cases-unusual-blood-clots-low-blood> (accessed on 10-9-2021).
29. Thakur, K.T., Tamborska, A., Wood, G.K., McNeill, E., Roh, D., Akpan, I.J., et al. (2021). Clinical review of cerebral venous thrombosis in the context of COVID-19 vaccinations: Evaluation, management, and scientific questions. *Journal of the neurological sciences*, 427, 117532.
30. Wise, J. (2021). Covid-19: European countries suspend use of Oxford-AstraZeneca vaccine after reports of blood clots. *BMJ (Clinical research ed.)*, 372, n699.
31. PRAC. (2021). Meeting highlights from the Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) 5-8 July 2021. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-pharmacovigilance-risk-assessment-committee-prac-5-8-july-2021> (accessed on 11-9-2021).
32. Rao, S. J., Khurana, S., Murthy, G., Dawson, E. T., Jazebi, N., & Haas, C. J. (2021). A case of Guillain-Barre syndrome following Pfizer COVID-19 vaccine. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 11(5), 597–600. <https://doi.org/10.1080/20009666.2021.1954284>.
33. Luk, A., Clarke, B., Dahdah, N., Ducharme, A., Krahn, A., McCrindle, B., et al. (2021). Myocarditis and Pericarditis following COVID-19 mRNA Vaccination: Practical Considerations for Care Providers. *The Canadian journal of cardiology*, S0828-282X(21)00624-3.
34. Shimabukuro, T. (2021). COVID-19 vaccine safety updates Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 23 June 2021. Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/meetings/downloads/slides-2021-06/03-COVID-Shimabukuro-508.pdf> (accessed on 12-9-2021).

35. Klein NP, Lewis N, Goddard K, et al. (2021). Surveillance for Adverse Events After COVID-19 mRNA Vaccination. *JAMA*. doi:10.1001/jama.2021.15072.
36. Heymans, S., & Cooper, L. T. (2022). Myocarditis after COVID-19 mRNA vaccination: clinical observations and potential mechanisms. *Nature reviews. Cardiology*, 19(2), 75–77. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00662-w>.
37. WHO. (2021). COVID-19 subcommittee of the WHO Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS): updated guidance regarding myocarditis and pericarditis reported with COVID-19 mRNA vaccines. Available online: <https://www.who.int/news/item/09-07-2021-gacvs-guidance-myocarditis-pericarditis-covid-19-mrna-vaccines> (accessed on 4-4-2021).
38. Koike, H., Chiba, A., & Katsuno, M. (2021). Emerging Infection, Vaccination, and Guillain-Barré Syndrome: A Review. *Neurology and therapy*, 1–15.
39. Therapeutic Goods Administration. (2021). COVID-19 vaccine weekly safety report - 19-08-2021. Available online: <https://www.tga.gov.au/periodic/covid-19-vaccine-weekly-safety-report-19-08-2021> (accessed on 12-9-2021).
40. HMA & EMA. (2017). Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP), 2017. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-pharmacovigilance-practices-annex-i-definitions-rev-4_en.pdf (accessed on 5-9-2021).
41. FDA. (2018). Finding and Learning about Side Effects (adverse reactions), 2018. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/information-consumers-and-patients-drugs/finding-and-learning-about-side-effects-adverse-reactions> (accessed on 5-9-2021).
42. Francis, A. I., Ghany, S., Gilkes, T., & Umakanthan, S. (2021). Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgraduate medical journal* 2021, 140654. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>.
43. Serviço Nacional de Saúde (SNS). (2022). Vaccination of children aged 5 to 11. [*Vacinação de crianças dos 5 aos 11*]. Available online: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2022/01/11/vacinacao-de-criancas-dos-5-aos-11/> (accessed on 5-2-2022).
44. INFARMED, I.P. (2016). Notificação de reações adversas/efeitos indesejáveis de medicamentos. Available online: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/portalram> (accessed on 4-4-2021).
45. Felicetti, P., Trotta, F., Bonetto, C., et al. Collaboration Vasculitis Working Group (2016). Spontaneous reports of vasculitis as an adverse event following immunization: A descriptive analysis across three international databases. *Vaccine*, 34(51), 6634–6640. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.027>
46. Lei n.º 21/2014 - Aprova a lei da investigação clínica. Available online: <https://dre.pt/dre/detalhe/lei/21-2014-25344024> (accessed on 4-4-2021).
47. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (OJ L 311, 28.11.2001, p. 67). Available online: https://ec.europa.eu/health/system/files/2016-11/dir_2001_83_cons_2012_en_0.pdf (accessed on 4-4-2021).
48. Brighton Collaboration. Interim case definition of thrombosis with thrombocytopenia (TTS). Available online: <https://brightoncollaboration.us/wp-content/uploads/2021/05/TTS-Interim-Case-Definition-v10.16.3-May-23-2021.pdf> (accessed on 9-4-2022).
49. Brighton Collaboration. Myocarditis/Pericarditis Case Definition. Available online: https://brightoncollaboration.us/wp-content/uploads/2021/07/BC-Myocarditis-Algorithm_-7-15-2021_FINAL.docx (accessed on 9-4-2022).
50. Brighton Collaboration. GBS Case Definition. Available online: https://brightoncollaboration.us/wp-content/uploads/2021/04/GBS_Decision-Tree-Algorithm.pdf (accessed on 9-4-2022).
51. EMA. (2014). Recommendation on harmonizing the approach to causality assessment for adverse events to veterinary medicinal products (revision 1), 2014. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/guidance/recommendation-harmonising-approach-causality-assessment-adverse-events-veterinary-medicinal> (accessed on 12-9-2021).
52. EMA. (2021). EudraVigilance: European database of suspected adverse drug reaction reports. Available online: <https://www.adrreports.eu/> (accessed on 23-10-2021).
53. EMA. (2022). Product-information templates – Human. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/product-information/product-information-templates-human> (accessed on 5-4-2022).
54. EMA. (2022). EudraVigilance database. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/pharmacovigilance/eudravigilance> (accessed on 8-4-2022).
55. EMA. (2021). EudraVigilance Disclaimer. Available online: <https://www.adrreports.eu/en/disclaimer.html> (accessed on 8-4-2022).
56. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). Suspected adverse reactions to COVID19 vaccination and the safety of substances of human origin, June 2021. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Suspected-adverse-reactions-to-COVID-19-vaccination-and-safety-of-SoHO.pdf> (accessed on 23-10-2021).
57. Riad, A., Pokorná, A., Mekhemar, M., Conrad, J., Klugarová, J., Koščík, M., et al. (2021). Safety of ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine: Independent Evidence from Two EU States. *Vaccines*, 9, 673.
58. Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A., Cárdenas, V., Shukarev, G., Grinsztejn, B., Spiessens, B., et al. (2021). ENSEMBLE Study Group Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*, 384, 2187–2201.
59. Wi, Y.M., Kim, S.H., & Peck, K.R. (2021). Early Adverse Events between mRNA and Adenovirus-Vectored COVID-19 vaccines in Healthcare Workers. *Vaccines*, 9, 931.
60. Greinacher, A., Thiele, T., Warkentin, T.E., Weisser, K., Kyrle, P.A., & Eichinger, S. (2021). Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 vaccination. *N Engl J Med*, 384, 2092-2101.
61. Brady, E., Nielsen, M. W., Andersen, J. P., & Oertelt-Prigione, S. (2021). Lack of consideration of sex and gender in COVID-19 clinical studies. *Nature communications*, 12, 4015.
62. Brüßow, H. (2021). COVID-19: vaccination problems. *Environmental microbiology*, 23, 2878–2890.
63. European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). COVID-19 vaccine Tracker. Available online: <https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#distribution-tab> (accessed on 8-4-2022).
64. THANZ Advisory Statement for Haematologists. (2021). Suspected Vaccine Induced Prothrombotic Immune Thrombocytopenia (VIPIT)/Vaccine induced immune thrombotic thrombocytopenia VITT). Available online: <https://www.racgp.org.au/FSEDEDEV/media/documents/RACGP/Coronavirus/THANZ-VIPIT-VITT-Advisory-statement.pdf> (accessed on 7-4-2022).
65. Dyer O. (2021). Covid-19: Regulators warn that rare Guillain-Barré cases may link to J&J and AstraZeneca vaccines. *BMJ (Clinical research ed.)*, 374, n1786.
66. Sadoff, J., Davis, K., & Douoguih, M. (2021). Thrombotic thrombocytopenia after Ad26.COV2.S vaccination— response from the manufacturer. *N Engl J Med*, 384, 1965-1966.
67. Kwong, J.C., Vasa, P.P., Campitelli, M.A., Hawken, S., Wilson, K., et al. (2013). Risk of Guillain-Barre syndrome after seasonal influenza vaccination and influenza health-care encounters: a self-controlled study. *Lancet Infect Dis*, 13, 769-776.
68. Kant, A., van Hunsel, F., & van Puijtenbroek, E. (2021). Numbers of spontaneous reports: How to use and interpret?. *British journal of clinical pharmacology*, 10.1111/bcp.15024. <https://doi.org/10.1111/bcp.15024>
69. EMA. (2022). Good pharmacovigilance practices. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/good-pharmacovigilance-practices> (accessed on 5-4-2022).

Ionic liquids as tools to improve gel formulations containing sparingly soluble phenolic acids

Líquidos iónicos como ferramentas para melhorar formulações gel contendo ácidos fenólicos pouco solúveis

Ana Júlio ^{1,2*}, Nádia Remtula ³, Marisa Nicolai ¹, Tânia Santos de Almeida ^{1,4*}

¹CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain; ³School of Sciences and Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ⁴Centro de Química Estrutural, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

*corresponding authors / autoras para correspondência: ana.julio@ulusofona.pt; tania.almeida@ulusofona.pt

Abstract

Hydroxycinnamic acids, namely caffeic and *p*-coumaric acids, have several pharmaceutical and cosmetic applications, but due to their low aqueous solubility, their applicability can be limited. Ionic liquids (ILs) have been shown to be a valuable tool to improve the solubility and assist in the incorporation of various phenolic compounds into delivery systems. Thus, this work aims to evaluate the impact of incorporating three choline-based ILs, namely (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-phenylalanine [Cho][Phe], (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-glutamate [Cho][Glu] and (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-glycinate [Cho][Gly], into an aqueous gel formulation containing the poorly soluble caffeic and *p*-coumaric acids. The results obtained confirm that the ILs not only increase the drug solubility, but also allow higher amounts of both studied drugs to be incorporated into the gels, without interfering with the stability of the aqueous gels. Moreover, the ILs altered the fluidity of the gels, both in the absence and presence of both phenolic acids, as they increase the viscosity of the formulations, contributing to higher flow resistance of the gel, which may be better accepted by the consumer.

Keywords: Ionic liquids; Hydroxycinnamic acids; Poorly soluble drugs; Gels; Increased Viscosity

Resumo

Os ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos cafeico e *p*-cumárico, têm várias aplicações farmacêuticas e cosméticas, mas devido à sua baixa solubilidade em água, a sua aplicabilidade pode ser limitada. Os líquidos iónicos (LI) têm demonstrado ser uma ferramenta valiosa para melhorar a solubilidade e auxiliar na incorporação de vários compostos fenólicos, em sistemas de veiculação. Assim, este trabalho visa avaliar o impacto da incorporação de três LI à base de colina, nomeadamente o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], o (2-hidroxietil)-trimetilamónio-L-glutamato [Cho][Glu] e (2-hidroxietil)-trimetilamónio-glicinato [Cho][Gly], numa formulação gel aquosa contendo os ativos pouco solúveis, ácidos cafeico e *p*-cumárico. Os resultados obtidos permitiram concluir que os LI não só aumentam a solubilidade do ativo, como também permitem incorporar maiores quantidades de ambos dos princípios ativos estudados nos géis, sem interferir na estabilidade dos géis aquosos. Adicionalmente, os LI também alteraram a fluidez dos géis, tanto na ausência como na presença dos ácidos fenólicos, uma vez que aumentaram a viscosidade das formulações, contribuindo para um gel com maior resistência ao fluxo, podendo por isso ser mais bem aceite pelo consumidor.

Palavras-chave: Líquidos iónicos; Ácidos hidroxicinâmicos; Fármacos de baixa solubilidade; Géis; Aumento da viscosidade

Introduction

The phenolic compounds with one carboxylic acid group are one of the main classes of natural compounds extracted from plants, present in several seeds, fruits skin and vegetables leaves (1,2). These phenolic acids, also known as phenolcarboxylic acids, are subdivided in two groups: hydroxybenzoic (with seven carbon atoms) and hydroxycinnamic (with nine carbon atoms) acids (1-5).

The hydroxycinnamic acids are the most studied class of the phenolic acids (2) and the most common compounds within this class are ferulic, caffeic, *p*-coumaric and sinapinic acids (1,3,6). These acids have a wide distribution on natural resources, such as in fruits (apples, blueberries, oranges and pineapples), vegetables (lettuce, potatoes and spinach) and other herbs (marjoram, oregano and rosemary) (1,4-6).

Presently, due to consumers' demands and environmental limitations, the pharmaceutical and cosmetic industries have searched for environmentally friendly resources as a source of drugs (1,6-8), such as the example of the hydroxycinnamic acids. This is one of the reasons for the growing number of works including these compounds. Several studies described the pharmaceutical and cosmetic activities of these molecules, such as antioxidant (5,9-11), anti-inflammatory (12), neuroprotective (13), anticancer (3,14,15), antilipidemic and antidiabetic (4,10). However, they present some limitations, due to their low solubility and bioavailability, which difficult their applicability (1,14,16-18).

In this context, ionic liquids (ILs) have been studied by our group as drug solubility promoters (14,17-20), namely with phenolic compounds (14,17,18). So, ILs can be used to improve drug loading of hydroxycinnamic acids into delivery systems. ILs are organic salts, that have melting points below 100 °C and some of them are liquids at room temperature (21-25).

In the pharmaceutical and cosmetic fields, they have been used with several goals, such as solvents and catalysts of active pharmaceutical excipients (26-29), as oil or water substitutes (26), as surfactants and viscosifiers in emulsions and microemulsions (14,17,30,31), as solubility enhancers (14,17-20,32) and integrated with nanoparticles (17,21,23,28,31). They act as a multifunctional tool since they may be tailored to achieve the most suitable properties, according with a desired applicability (14,24,28,33). And also, they present some properties that can be

Introdução

Os compostos fenólicos contendo um grupo ácido carboxílico são denominados ácidos fenólicos ou fenolcarboxílicos, que são uma das principais classes de compostos naturais extraídos de plantas, pois estão presentes em diversas sementes, casca de frutas e folhas (1,2). Estes ácidos fenólicos subdividem-se em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (com sete átomos de carbono) e ácidos hidroxicinâmicos (com nove átomos de carbono) (1-5).

Os ácidos hidroxicinâmicos são a classe mais estudada dos ácidos fenólicos (2) e os compostos mais comuns dentro desta classe são os ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico e sinápico (1,3,6). Estes ácidos têm uma ampla distribuição na natureza, como em frutas (maçãs, mirtilos, laranjas e abacaxis), vegetais (alface, batata e espinafre) e ervas aromáticas (manjerona, orégão e alecrim) (1,4-6).

Atualmente, devido às exigências dos consumidores e às limitações ambientais, as indústrias farmacêutica e cosmética têm procurado recursos ecológicos como fonte de princípios ativos (1,6-8), como é o caso dos ácidos hidroxicinâmicos. Esta é uma das razões para o crescente número de publicações que incluem estes compostos. Vários estudos descrevem as atividades farmacêuticas e cosméticas dessas moléculas, como antioxidante (5,9-11), anti-inflamatória (12), neuroprotetora (13), anticancerígena (3,14,15), antilipidêmica e antidiabética (4,10). No entanto, apresentam algumas limitações, devido à sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, o que limita a sua aplicabilidade (1,14,16-18).

Neste contexto, os líquidos iônicos (LI) também têm sido estudados pelo nosso grupo como promotores de solubilidade de princípios ativos (14,17-20), nomeadamente de compostos fenólicos (14,17,18). Assim, os LI podem ser usados para melhorar a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos em sistemas de veiculação. Os LI são sais orgânicos, que possuem pontos de fusão inferiores a 100 °C e, alguns deles, são líquidos à temperatura ambiente (21-25).

Nas áreas farmacêutica e cosmética, têm sido utilizados com diversos objetivos, tais como solventes e catalisadores de excipientes farmacêuticos ativos (26-29), como substitutos de fases oleosas ou aquosas (26), como surfactantes e viscosificantes em emulsões e microemulsões (14,17,30,31), como promotores de solubilidade (14,17-20,32) e integrados em nanopartículas (17,21,23,28,31). Eles atuam como

useful, for example high thermal and chemical stability, re-usability and nonflammability (22,23,28). However, it is also important to consider the toxicity of ILs. For instance, it has been shown, that choline-amino acid ILs are amongst the least toxic ILs (22) and may be more suited to be included in delivery systems. Nonetheless, several studies, performed in different cell lines, have shown that the toxicity of this class of ILs is concentration-dependent (14,18,22) and this should be considered when studying their applicability.

Concerning the hydroxycinnamic acids their topical applicability may be relevant due to some of their properties, already described, such as their antioxidant activity (2,4,7). Regarding this, emulsions and gels are quite suitable as topical delivery systems (7,19). In terms of emulsions, our group already showed the utility of using ILs containing amino acids to enhance the solubility of the hydroxycinnamic acids and they allowed a higher incorporation of these compounds in oil-in-water emulsions (14). Besides that, that study also proved that ILs can be useful to improve the stability and alter the viscosity of the developed topical delivery systems (14). Since emulsions are thermodynamically unstable formulations (7,19), in some cases, gels may be a suitable alternative, justifying their development in the presence of ILs.

Gels can be classified according to the nature of the solid phase, as colloidal, molecular, and polymeric (34,35). They may also be classified according to the liquid phase, as hydrogels (water), organogels (an organic solvent), polymer liquid gels, oleogels (oil) and ionic liquid gels (liquid phase constituted only by ILs). The combination of gels with ILs has led to improved functional materials that have been used in different areas, such as electronics, green chemistry, cosmetics and pharmaceutical,(34,35) showing the potential of this combination.

In the pharmaceutical and cosmetic fields, topical gels are widely used and these semisolid formulations, are formed by the dispersion of small or large molecules in an aqueous liquid vehicle that is jellified with the gelling agent addition (36). These vehicles may have aqueous, hydroalcoholic, alcohol or non-aqueous mean (36,37). Carbopol® is a gelling agent used as a thickener (38), emulsifier (39) and stabilizer (40) in topical formulations such as gels. In a preliminary study, we showed that ILs improved the incorporation of caffeine into Carbopol® gel formulations (19). Herein we assessed if ILs could also improve the incorporation of phenolic acids into this type of topical formulation. Nonetheless, although gels are more stable than

ferramenta multifuncional, uma vez que podem ser adaptados para alcançar as propriedades mais adequadas, de acordo com uma aplicabilidade desejada (14,24,28,33). Além disso, apresentam algumas propriedades que podem ser úteis, como por exemplo, a sua alta estabilidade térmica e química, a possibilidade de reutilização e a não inflamabilidade (22,23,28). No entanto, também é importante considerar a toxicidade dos LI. Por exemplo, foi demonstrado que os LI de colina estão entre os LI menos tóxicos (22) e podem ser os mais adequados para serem incluídos em sistemas de veiculação. Contudo, vários estudos realizados em diferentes linhas celulares, mostraram que a toxicidade dessa classe de LI é dependente da concentração dos mesmos (14,18,22) e isso deve ser considerado ao estudar sua aplicabilidade.

Em relação aos ácidos hidroxicinâmicos, a sua aplicação tópica pode ser relevante devido a algumas das suas propriedades já descritas, como a atividade antioxidante (2,4,7). A esse respeito, emulsões e géis são bastante adequados como sistemas de veiculação tópicos (7,19). Relativamente às emulsões, o nosso grupo já mostrou a utilidade do uso de LI contendo aminoácidos para aumentar a solubilidade dos ácidos hidroxicinâmicos, permitindo uma maior incorporação desses compostos em emulsões óleo-em-água (14). Além disso, esse estudo também provou que os LI podem ser úteis para melhorar a estabilidade e alterar a viscosidade dos sistemas de veiculação tópica desenvolvidos (14). Como as emulsões são formulações termodinamicamente instáveis (7,19), em alguns casos, os géis podem ser uma alternativa adequada, justificando o seu desenvolvimento na presença de LI.

Os géis podem ser classificados de acordo com a natureza da fase sólida, como coloidais, moleculares e poliméricos (34,35). Também podem ser classificados de acordo com a fase líquida, como hidrogéis (água), organogéis (solvente orgânico), géis líquidos poliméricos, oleogéis (óleo) e géis líquidos iônicos (fase líquida constituída apenas por LI). A combinação de géis com LI originou materiais funcionais melhorados que têm sido utilizados em diversas áreas, como eletrônica, química “verde”, cosmética e farmacêutica, (34),(35) mostrando o potencial desta combinação.

Na área farmacêutica e cosmética, os géis tópicos são amplamente utilizados e essas formulações semissólidas são formadas pela dispersão de moléculas pequenas ou grandes num veículo líquido aquoso que é gelificado com a adição do agente gelificante (36). Esses veículos podem ter meio aquoso, hidroalcoólico, alcoólico ou não-aquoso (36,37). O Carbopol® é um agente

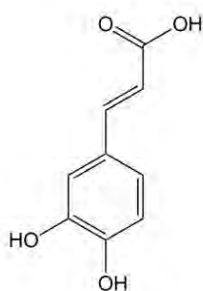
emulsions, they may still have some stability problems, such as separation between the solids and the liquids components within the formulation and biological growth, especially gels containing water (19,41,42). Consequently, ILs may also be a valuable strategy to improve these formulations.

With all of this in mind, the goal of this work was to evaluate the performance of aqueous gels containing caffeic or *p*-coumaric acids (Figure 1A), in the presence and absence of three different choline-based ILs (Figure 1B). The impact of the ILs on the developed formulations and on the drug incorporation into those gels, was evaluated.

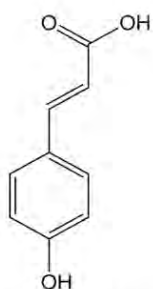
gelificante utilizado como espessante (38), emulsificante (39) e estabilizador (40) em formulações tópicas como géis. Num estudo preliminar, mostrámos que os LI melhoram a incorporação de cafeína em formulações de gel Carbopol® (19). No presente estudo, avaliámos se os LI também podem melhorar a incorporação de ácidos fenólicos neste tipo de formulação tópica. No entanto, embora os géis sejam mais estáveis que as emulsões, eles podem ainda apresentar alguns problemas de estabilidade, como a separação entre os componentes sólidos e líquidos, dentro da formulação e crescimento biológico, especialmente géis contendo água (19,41,42). Consequentemente, os LI também podem ser uma estratégia valiosa para melhorar essas formulações.

Tendo tudo isso em linha de conta, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de géis aquosos contendo ácidos cafeico ou *p*-cumárico (Figura 1A), na presença e ausência de três LI à base de colina diferentes (Figura 1B). Foi avaliado o impacto dos LI nas formulações desenvolvidas e na incorporação dos ativos nesses géis.

A) Drugs / Fármacos



Caffeic Acid / Ácido Cafeico



p-Coumaric Acid / Ácido *p*-Cumárico

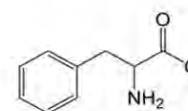
B) Ionic liquids / Líquidos iónicos

Ionic liquid /
Líquido Iónico

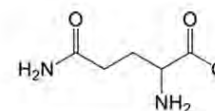
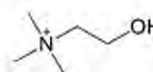
Cation /
Catião

Anion /
Anião

[Cho][Phe]



[Cho][Glu]



[Cho][Gly]

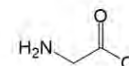


Figure 1 - Chemical structures of the drugs (A) and the ionic liquids (B) studied.

Figura 1 - Estrutura química dos fármacos (A) e dos líquidos iónicos (B) em estudo.

Materials and Methods

Materials and Reagents

Three choline based-ILs were used: (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-phenylalaninate [Cho][Phe], the (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-L-glutamate [Cho][Glu] and the (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium-glycinate [Cho][Gly]. All ILs had been prepared within the context of other studies recently developed by our group (14,18).

The drugs chosen were two hydroxycinnamic acids, caffeic acid (CA) and *p*-coumaric acid (*p*-CA), (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The gel formulation also included Carbopol® 940 and triethanolamine (both José Vaz Pereira, Benavente, Portugal), propylene glycol (Fragron, Barcelona, Spain) and the paraben concentrate, which was prepared according to the Farmacopeia Portuguesa VIII using methylparaben and propylparaben (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Synthesis of the Choline-based ILs

As mentioned above, the synthesis and all characterization of the studied ILs was performed within the scope of other studies conducted by our group (14,18). Briefly, each amino acid, 57.79 mmol, was solubilized in water and this solution was added to 57.76 mmol choline hydroxide, after evaporation. The resulting blend was stirred overnight. The solvent was then evaporated, followed by the addition of an acetonitrile:methanol (9:1). The obtained mixture was centrifuged, for 30 minutes at 1500 rpm, filtered, and then evaporated to remove the solvents. All the ILs were stored under moisture-free conditions and evaporated again before use.

Solubility Studies

Solubility studies were performed as previously described (14,18). Briefly, saturated solutions of each drug in water and water:IL mixtures (99.8:0.2% w/w) were prepared. The IL concentration used (0.2 %, v/v) allows the maintenance of cell viability of human keratinocytes (HaCaT cells), accordingly to previously published results (14,19). All solutions were prepared in triplicate.

Materiais e Métodos

Materiais e Reagentes

Foram utilizados três LI à base de colina: o (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio-L-fenilalaninato [Cho][Phe], o (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio-L-glutamato [Cho][Glu] e o (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio-glutinato [Cho][Gly]. Todos os LI foram preparados no contexto de outros estudos recentemente desenvolvidos pelo nosso grupo (14,18) e foram também utilizados neste estudo.

Os fármacos escolhidos foram dois ácidos hidroxicinnâmicos, ácido cafeico (CA) e ácido *p*-cumárico (*p*-CA), ambos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Adicionalmente, foi utilizado para a formulação gel Carbopol® 940 e trietanolamina, ambos adquiridos à José Vaz Pereira (Benavente, Portugal), o propilenoglicol da Fragon (Barcelona, Espanha), e o concentrado de parabenos, que foi preparado de acordo com a Farmacopeia Portuguesa VIII com metilparabeno e propilparabeno ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Síntese dos ILs à base de colina

Conforme mencionado acima, a síntese e toda a caracterização dos LI estudados foi realizada no âmbito de outros estudos realizados por nosso grupo (14,18). Sucintamente, cada aminoácido, 57,79 mmol, foi solubilizado em água e esta solução foi adicionada a 57,76 mmol de hidróxido de colina, após evaporação. Depois disso, a mistura resultante foi agitada durante a noite e o solvente foi evaporado, seguido pela adição de acetonitrilo:metanol (9:1). A mistura obtida foi centrifugada, por 30 minutos a 1500 rpm, filtrada e depois evaporada para remover os solventes. Todos os LI foram armazenados em condições livres de humidade e, antes de usar é novamente evaporado.

Estudos de Solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados conforme descrito anteriormente na literatura (14,18). Resumidamente, foram preparadas soluções saturadas de cada ativo em água e misturas de água:LI (99,8:0,2 % m/m). Os LI utilizados foram incorporados usando uma concentração igual para todos (0,2 % v/v), que permite a manutenção da viabilidade celular de queratinócitos humanos (células HaCaT), de acordo com resultados previamente publicados (14,19). Todas as soluções foram preparadas em triplicado.

Table 1 - Qualitative and quantitative composition of the gels, % (w/w), with and without IL, [Cho][Phe], [Cho][Glu] or [Cho][Gly], and in the presence and absence of caffeic or *p*-coumaric acids.

Tabela 1 - Composição qualitativa e quantitativa dos géis, % (m/m), com e sem LI, [Cho][Phe], [Cho][Glu] ou [Cho][Gly], e na presença e ausência de ácido cafeico ou *p*-cumárico.

Components/ Componentes	Without drug and without IL / Sem ativo e sem LI	With drug and without IL / Com ativo e sem LI	With IL without Drug / Com LI e sem ativo	With drug and with IL / Com ativo e com LI
Carbopol® 940	0.5	0.5	0.5	0.5
Propylene glycol / Propilenoglicol	5.0	5.0	5.0	5.0
Paraben concentrate / Concentrado de parabenos	1.0	1.0	1.0	1.0
IL/LI	-	-	0.2	0.2
Drug / Fármaco	-	Maximum solubility ¹ / Máxima solubilidade ¹	-	Maximum solubility ¹ / Máxima solubilidade ¹
Triethanolamine/ Trietanolamina		q.s. / q.b.p. pH = 5		
Distilled water / Água destilada		q.s. / q.b.p. 100		

¹According to the results obtained in the solubility studies. / ¹De acordo com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade.

These solutions then were mixed on a horizontal shaker (IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Germany) for a period of 72 h at 25±2 °C. The solutions were then filtered. Finally, the samples were analyzed using a UV-visible spectrophotometer (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, England), at the maximum absorption wavelength in water (286 nm for *p*-coumaric acid and 313 nm for caffeic acid).

Development of the aqueous gel formulation

The aqueous gel formulations were individually prepared (19) in the presence and absence of each studied IL ([Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly]) and with and without each drug (caffeic or *p*-coumaric acids) (Table 1). All raw materials were previously weighed. The distilled water and the IL were placed in a beaker. The drug was then dissolved under stirring. After the drug was completely dissolved, the paraben concentrate, and propylene glycol were added. Finally, Carbopol® 940 was added under vigorous agitation and in shower mode until a homogeneous formulation was reached. After each formulation was prepared, the pH was adjusted with triethanolamine to pH 5 (19).

Em seguida, as soluções foram homogeneizadas num agitador horizontal (IKA VIBRAX VXR®, LTF Labortechnik GmbH & Co., Bodensee, Alemanha) por um período de 72 h a 25±2 °C e foram posteriormente filtradas. Para finalizar, as amostras foram analisadas utilizando um espectrofotómetro UV-visível (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), as leituras foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção para cada composto em água (286 nm para o ácido *p*-cumárico e 313 nm para o ácido cafeico).

Desenvolvimento da formulação do gel aquoso

As formulações em gel aquoso foram preparadas (19), na presença e ausência de cada LI estudado ([Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly]), com e sem cada princípio ativo, ácido cafeico ou *p*-cumárico, individualmente (Tabela 1). Todas as matérias-primas foram pesadas previamente. A água destilada e o LI foram colocados num copo de precipitação e, em seguida, o princípio ativo foi dissolvido sob agitação. Após a dissolução completa do princípio ativo, o concentrado de parabenos e o propilenoglicol foram adicionados à mistura. Finalmente, sob agitação vigorosa em forma de chuva, foi adicionado Carbopol® 940, até se chegar

The organoleptic properties, pH and viscosity of all formulations were analyzed at time zero and after the preliminary stability studies. For the viscosity, all samples were held at 25 °C, then homogenized using a glass rod for 2 minutes. Viscosity was then measured in a rheometer (DV3T from AMETEK®, Brookfield, Preston, United Kingdom) using a S19 probe. The pH was evaluated with a pH meter (Metrohm® 827, Herisau, Switzerland).

Preliminary stability studies of the produced formulations

All formulations (n=3) were submitted to a gradual heating test and a centrifugation test, according to the protocols described in the literature (14,17,41) to assess stability.

In the gradual heating test, 5.0 g of each gel was placed in a thermostatic bath, from an initial temperature of 40 °C to a final temperature of 80 °C, increasing the temperature 10 °C every 30 minutes. A centrifugation test was also performed, in which 5.0 g of each formulation was heated at 45 °C for 30 min and then centrifuged for 30 min at 7200×g.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, San Diego, MO, USA), using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test of differences in mean values of the results. Values were expressed as mean±standard deviation (SD). Differences between individual means were significant with * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

Results and Discussion

This work aimed to evaluate the impact of the incorporation of three different choline-based ILs, [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly], on aqueous gels in the absence or presence of poorly soluble caffeic or *p*-coumaric acids. All studies were performed incorporating an equal concentration of each IL to enable comparison. As a topical application is sought, the chosen concentration allows the maintenance of the cell viability on human keratinocytes (HaCaT cells), according to studies previously published by our group (14,19)

a uma formulação homogênea. Após a preparação da formulação, o pH foi ajustado, com trietanolamina, para um valor igual a 5 (19).

As propriedades organolépticas, pH e viscosidade de todas as formulações foram analisadas no tempo zero e após os estudos preliminares de estabilidade. Para viscosidade, todas as amostras foram colocadas a 25 °C, sendo depois homogeneizadas com uma vareta de vidro durante 2 minutos. De seguida, a viscosidade foi medida com um reómetro (DV3T da AMETEK®, Brookfield, Preston, Reino Unido), com a sonda S19. O pH foi avaliado com um potenciômetro pH 827 (Metrohm®, Herisau, Suíça).

Estudos de estabilidade preliminar das formulações produzidas

Todas as formulações (n=3) foram submetidas ao teste de aquecimento gradual e ao teste de centrifugação, de acordo com os protocolos descritos na literatura (14,17,41), para detetar a ocorrência de algum fenómeno de instabilidade.

No teste de aquecimento gradual, foram pesados 5,0 g de cada gel, que posteriormente foram colocados num banho termostatizado, partindo de uma temperatura inicial de 40 °C até uma temperatura final de 80 °C, com um incremento de 10 °C/30 minutos. O teste de centrifugação também foi realizado, no qual 5,0 g de cada formulação foram aquecidos a 45 °C, durante 30 min, e centrifugados durante 30 min a 7200× g.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 5® da GraphPad Software (San Diego, MO, EUA), através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey das diferenças nos valores médios dos resultados. Os valores foram expressos como média±desvio padrão (DP). As diferenças entre as médias individuais foram significativas com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Resultados e Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da incorporação de três LI diferentes à base de colina, [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly], em géis aquosos na ausência ou na presença dos ácidos cafeico ou *p*-cumárico pouco solúveis. Adicionalmente, para fins de comparação, todos os estudos foram realizados incorporando uma concentração igual de cada LI,

Solubility studies

To the best of our knowledge, the solubility of caffeic and *p*-coumaric acids in water:[Cho][Glu] (99.8:0.2 %w/w) is determined herein for the first time. This IL was selected by virtue of recent promising results of its incorporation into lipidic implants (25), allowing an improvement of the developed systems. Within this study we intended to explore its impact on another type of delivery system. The solubility of these phenolic acids in water and in the presence of water:[Cho][Phe] and water:[Cho][Gly] (99.8:0.2% w/w) has been previously studied (14). Nonetheless, all these solubilities were performed here for comparison and to ensure that the solubility of caffeic and *p*-coumaric acids in water:[Cho][Glu] (99.8:0.2 % w/w) was determined under the same experimental conditions.

que permite a manutenção da viabilidade celular em queratinócitos humanos (células HaCaT), uma vez que se pretende uma aplicação tópica, de acordo com estudos previamente publicados pelo nosso grupo (14,19).

Estudos de solubilidade

De acordo com o que sabemos, a solubilidade dos ácidos cafeico e *p*-cumárico na água:[Cho][Glu] (99,8:0,2 %m/m) é aqui determinada pela primeira vez. Este LI foi escolhido, uma vez que recentemente demonstrou resultados promissores quando incorporado em implantes lipídicos (25), ao permitir melhorar os sistemas desenvolvidos e, conseqüentemente, pretendeu-se neste estudo explorar o seu impacto nouro tipo de sistemas de veiculação. As solubilidades destes ácidos fenólicos na água e na presença de água:[Cho][Phe] e de água:[Cho][Gly] (99,8:0,2 %m/m) já foram estudadas (14). No entanto, todas essas solubilidades foram novamente realizadas para comparação e garantindo que a solubilidade dos ácidos cafeico e *p*-cumárico na água:[Cho][Glu] (99,8:0,2 %m/m) seja determinada nas mesmas condições.

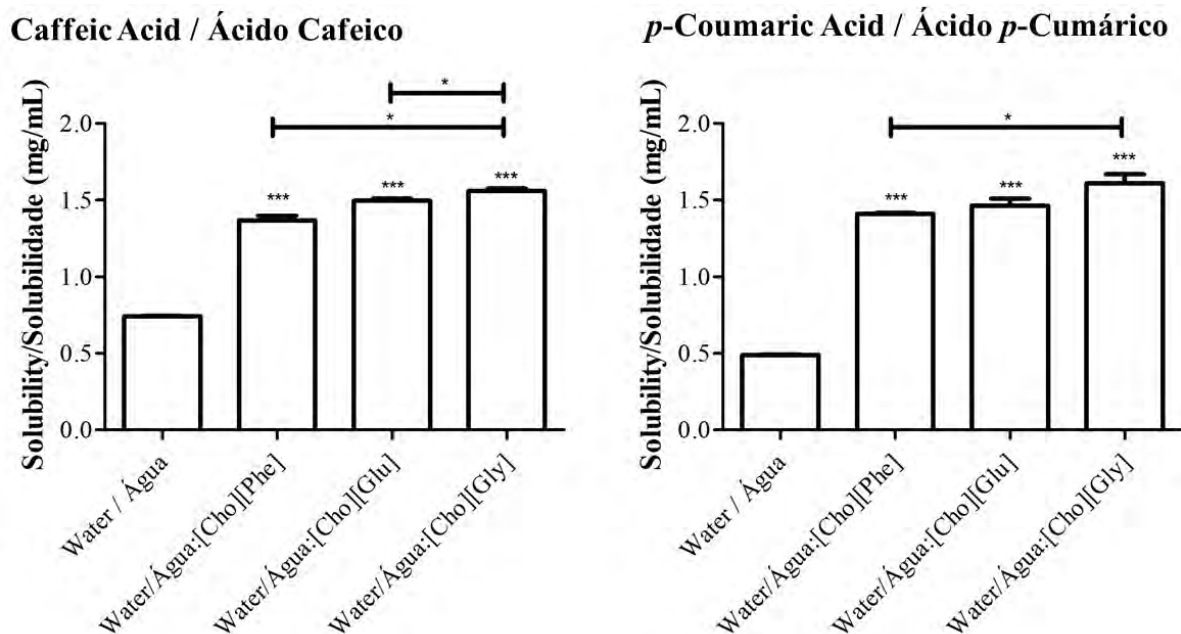


Figure 2 - Solubility of caffeic acid and *p*-coumaric acid in water or water:IL mixtures (99.8:0.2, % w/w) at 25±2 °C. n=3, mean±SD, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (ANOVA, Tukey's test). The ILs used were [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly].

Figura 2 - Solubilidade de ácidos cafeico e *p*-cumárico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, % m/m) a 25±2 °C. n=3, média±DP, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Tukey). Os LI usados foram [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].

Table 2 - Solubility of caffeic acid and *p*-coumaric acid in water or water:IL mixtures (99.8:0.2, % w/w) at 25±2 °C. n=3, mean±SD. The ILs used were [Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly].

Tabela 2 - Solubilidade de ácidos cafeico e *p*-cumárico em água ou misturas de água:LI (99,8:0,2, % m/m) a 25±2 °C. n=3, média±DP. Os LI usados foram [Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly].

Solubility (mg/mL) in / Solubilidade (mg/mL) em	Water / Água	[Cho][Phe]	[Cho][Glu]	[Cho][Gly]
Caffeic acid / Ácido cafeico	0.49 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.46 ± 0.01	1.61 ± 0.04
<i>p</i> -Coumaric acid / Ácido <i>p</i> -cumárico	0.74 ± 0.01	1.37 ± 0.03	1.49 ± 0.01	1.56 ± 0.01

The solubilities of the hydroxycinnamic acids in water at 25 °C were determined to be 0.49±0.01 mg/mL for caffeic acid and 0.74±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid (Figure 2 and Table 2). For caffeic acid, this result is in agreement with a recently published study (0.45±0.04 mg/mL)(14) but slightly lower than the results obtained in a previous work (0.98±0.02 mg/mL) (16), although both studies described a solubility below 1 mg/mL. The results for the solubility of *p*-coumaric acid are in agreement with two studies presented in the literature (both with a solubility of 0.7 mg/mL) (14,43). For the solubility of both phenolic compounds in water: [Cho][Phe] (1.41±0.01 mg/mL for caffeic acid and 1.37±0.03 mg/mL for *p*-coumaric acid) and in water:[Cho][Gly] (1.61±0.04 mg/mL for caffeic acid and 1.56±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid), the current results are also in agreement with the previously published data (1.42±0.08 mg/mL with [Cho][Phe] and 1.39±0.07 mg/mL with [Cho][Gly] for caffeic acid and 1.39±0.02 mg/mL with [Cho][Phe] and 1.54±0.07 mg/mL with [Cho][Gly] for *p*-coumaric acid)(14) (Table 2).

Concerning to the solubility of the phenolic compounds in water: [Cho][Glu] mixture (1.46±0.01 mg/mL for caffeic acid and 1.49±0.01 mg/mL for *p*-coumaric acid) proved to be quite similar to those obtained for the other choline-based ILs (Figure 2 and Table 2).

The solubility results, in the presence of the ILs, are all statistical different from the solubility results obtained for the phenolic acids in water alone (Figure 2 and Table 2).

Os resultados obtidos para a solubilidade dos ácidos hidroxicinâmicos na água, a 25 °C, foram 0,49±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 0,74±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico (Figura 2 e Tabela 2). Para o ácido cafeico, os resultados estão de acordo com um estudo publicado recentemente (0,45±0,04 mg/mL) (14), mas um pouco inferior aos resultados obtidos num trabalho anterior (0,98±0,02 mg/mL) (16), embora ambos os estudos descreveram uma solubilidade abaixo de 1 mg/mL. Os resultados para a solubilidade do ácido *p*-cumárico estão de acordo com dois estudos apresentados na literatura (ambos com solubilidade de 0,7 mg/mL) (14,43). Para a solubilidade dos dois compostos fenólicos em água: [Cho][Phe] (1,41±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 1,37±0,03 mg/mL para o ácido *p*-cumárico) e em água: [Cho][Gly] (1,61±0,04 mg/mL para o ácido cafeico e 1,56±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico), os resultados atuais também estão consonantes com os dados anteriormente publicados (1,42±0,08 mg/mL com [Cho][Phe] e 1,39±0,07 mg/mL com [Cho][Gly] para o ácido cafeico e 1,39±0,02 mg/mL com [Cho][Phe] e 1,54±0,07 mg/mL com [Cho][Gly] para o ácido *p*-cumárico)(14) (Tabela 2).

Quanto às solubilidades dos compostos fenólicos na mistura água:[Cho][Glu] (1,46±0,01 mg/mL para o ácido cafeico e 1,49±0,01 mg/mL para o ácido *p*-cumárico), provou serem bastante semelhantes aos obtidos para outros LI à base de colina (Figura 2 e Tabela 2).

Os resultados da solubilidade, na presença dos LI, são todos estatisticamente diferentes dos resultados da solubilidade de cada ácido fenólico obtido apenas em água (Figura 2 e Tabela 2).

This work, therefore, allowed us to conclude that [Cho][Glu] also improves the drug solubility of caffeic and *p*-coumaric acids and reinforces the fact that choline-based ILs may be useful as solubility promoters of sparingly soluble phenolic acids.

Following these results and considering that both drugs may have potential for a topical application (3,7,14), aqueous gel formulations were developed, in the presence and absence of each IL and/or each phenolic compound studied herein, to assess if whether these salts would have an impact on the developed formulations.

Development of gel formulations

For the preparation of the gel formulations, firstly the control gel was first prepared, containing no drug or IL. Subsequently, the drugs were incorporated into the gels individually, in the presence or absence of each IL. Each drug was incorporated in the formulations at the maximum (water) soluble concentration or in the corresponding water:IL mixture (99.8:0.2 % w/w), according to the results obtained in the solubility studies. Hence, several formulations were prepared, as described in Table 1, namely: a control gel, without IL or drug; gels containing each drug but without IL; gels incorporating each IL but without drug; and finally, the gels containing each IL and each drug.

Preliminary stability studies were carried out to assess if the prepared gels were stable and if the incorporation of ILs into the formulations would impact their stability. Thus, all the formulations were subjected to extreme conditions, through the gradual heating test and the centrifugation test. All gels were thermally and physically stable, indicating that the incorporation of ILs does not interfere with the stability of the aqueous gels. Moreover, the pH of all formulations was unaltered after the preliminary stability studies.

The organoleptic properties of the gels were observed macroscopically (Figure 3). All gel formulations are colourless and translucent (Figure 3).

In terms of consistency, the formulations without IL (the control gel, A_0 , and the gels containing each drug but without IL, A_{CA} and A_{p-CA}), presented a higher fluidity (Figure 3 A_0 , A_{CA} and A_{p-CA}).

On the other hand, the gels containing IL, either in the absence (B_0 , C_0 and D_0) or in the presence of each drug (B_{CA} , C_{CA} , D_{CA} , B_{p-CA} , C_{p-CA} and D_{p-CA}) presented a less fluid and more pleasant appearance for a gel formulation (Figure 3 B_0 , C_0 and D_0). Thus, our results seem to indicate that the presence of the

Assim, este trabalho permitiu concluir que [Cho][Glu] melhora a solubilidade dos princípios ativos, ácidos cafeico e *p*-cumárico, e reforçar o fato de que os LI à base de colina podem ser úteis como promotores de solubilidade dos ácidos fenólicos pouco solúveis em água.

De acordo com esses resultados e considerando que ambos os fármacos podem ter potencial para uma aplicação tópica (3,7,14), foram desenvolvidas formulações em gel aquoso, na presença e ausência de cada LI e/ou cada composto fenólico aqui estudado, para avaliar se esses sais têm impacto sobre as formulações desenvolvidas.

Desenvolvimento de formulações de géis

Para a preparação das formulações do gel, primeiro foi preparado o gel controlo, que não contém princípio ativo ou LI. Seguidamente, os fármacos foram incorporados nos géis individualmente e na presença ou ausência de cada LI. Cada princípio ativo foi incorporado nas formulações na sua concentração máxima de solubilidade em água ou na mistura correspondente de água:LI (99,8:0,2 %m/m), de acordo com os resultados obtidos nos estudos de solubilidade. Assim, várias formulações foram preparadas, conforme descrito na Tabela 1, a saber: um gel controlo, sem LI, nem princípio ativo; géis contendo cada princípio ativo, mas sem LI; géis incorporando cada LI, mas sem princípio ativo; e, finalmente, os géis contendo cada LI e cada princípio ativo.

Após a preparação, foram realizados estudos preliminares de estabilidade para avaliar se os géis preparados eram estáveis e se a incorporação do LI nas formulações afetaria sua estabilidade. Assim, todas as formulações foram submetidas a condições extremas, através do teste de aquecimento gradual e do teste de centrifugação, tendo todos os géis demonstrado serem estáveis térmica e fisicamente. Isso mostrou que a incorporação de LI não interfere na estabilidade dos géis aquosos. Além disso, os pH de todas as formulações não se alteraram depois dos ensaios de estabilidade preliminar.

As propriedades organolépticas dos géis foram observadas macroscopicamente (Figura 3). Todas as formulações de gel são incolores e translúcidas (Figura 3).

Em termos de consistência, as formulações sem LI (o gel de controlo, A_0 , e os géis contendo cada princípio ativo, mas sem LI, A_{CA} e A_{p-CA}), apresentavam uma fluidez muito elevada (Figura 3 A_0 , A_{CA} e A_{p-CA}).

ILs may increase the viscosity of the prepared gels, either in the presence or in the absence of the studied drugs. This may be important, since a higher viscosity may contribute to a smaller flow velocity of the semi-solid or liquid formulations, due to the increase in the flow resistance (44,45). A less fluid gel may be more appealing to the consumer, since it is more practical to apply and may be more effective, due to longer skin contact time (36,37,44).

Consequently, the gel viscosities were then evaluated, and the results obtained confirmed the macroscopical observations (Figure 3), showing that the presence of the ILs led to a considerably increase in the viscosity of the formulations. Moreover, the control formulation - without drug and without IL - presented a viscosity similar to the formulations containing drug, but without

Por outro lado, os géis contendo LI, seja na ausência (B_0 , C_0 e D_0) ou na presença de cada princípio ativo (B_{CA} , C_{CA} , D_{CA} , B_{p-CA} , C_{p-CA} e D_{p-CA}) apresentaram um aspeto menos fluido e mais agradável para uma formulação de gel (Figura 3 B_0 , C_0 e D_0). Assim, os nossos resultados parecem indicar que a presença dos LI podem aumentar a viscosidade dos géis preparados, seja na presença ou na ausência dos fármacos estudados. Isso pode ser importante, já que uma viscosidade maior pode contribuir para uma menor taxa de fluxo das formulações semissólidas ou líquidas, devido ao aumento da resistência ao fluxo (42,43). Um gel menos fluido pode ser mais atraente para o consumidor, pois é mais prático de aplicar e pode ser mais eficaz, devido ao maior tempo de contato com a pele (39,40,42).

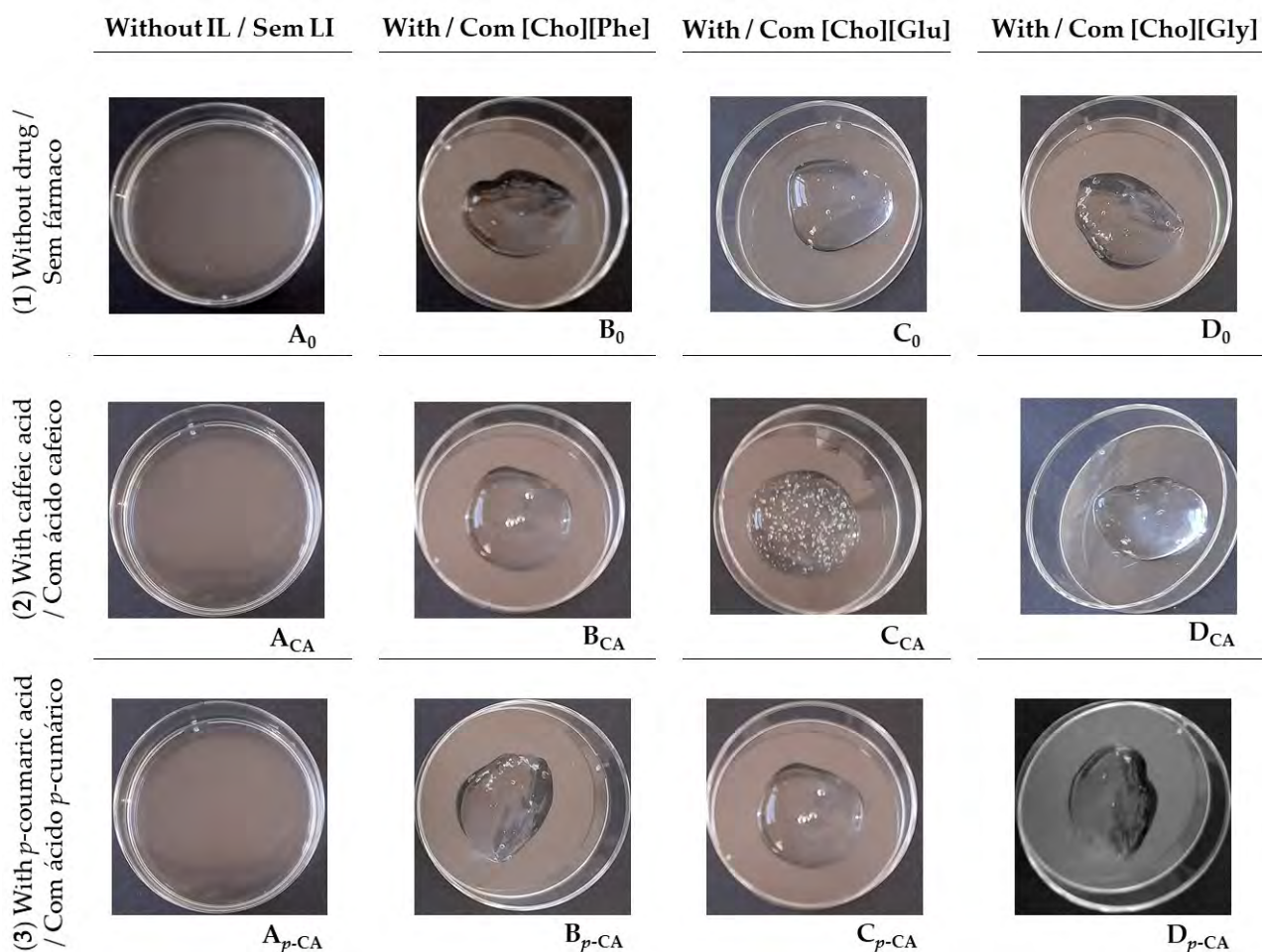


Figure 3 - Macroscopic appearance of all the prepared gels: without drug and without IL – A_0 ; with each drug (caffeic or *p*-coumaric acid) and without IL – A_{CA} and A_{p-CA} ; without drug and with each IL ([Cho][Phe], [Cho][Glu] or [Cho][Gly]) – B_0 , C_0 , D_0 ; with each drug and each IL – B_{CA} , B_{p-CA} , C_{CA} , C_{p-CA} , D_{CA} and D_{p-CA} .

Figura 3 - Aparência macroscópica de todos os géis preparados: sem fármaco e sem LI – A_0 ; com cada ativo (ácido cafeico ou *p*-cumárico) e sem LI – A_{CA} and A_{p-CA} ; sem ativo e com cada LI ([Cho][Phe], [Cho][Glu] ou [Cho][Gly]) – B_0 , C_0 , D_0 ; com cada ativo e cada LI – B_{CA} , B_{p-CA} , C_{CA} , C_{p-CA} , D_{CA} and D_{p-CA} .

Table 3 - Measured viscosity of the gels prepared in the presence and absence of each drug (caffeic or *p*-coumaric acids) and/or with and without the choline-based ILs ([Cho][Phe], [Cho][Glu] and [Cho][Gly]) at 0.2 % (v/v).

Tabela 3 - As viscosidades medidas nos geles preparados na presença e ausência de cada fármaco (ácidos cafeico e *p*-cumárico) e com, ou sem, os LI derivados de colina ([Cho][Phe], [Cho][Glu] e [Cho][Gly]) a 0,2 % (v/v).

Viscosity / Viscosidade (mPas)	Without IL / Sem LI	With/Com [Cho][Phe]	With/Com [Cho][Glu]	With/Com [Cho][Gly]
Without drug / Sem fármaco	1700 ± 40	14320 ± 50	14560 ± 50	15200 ± 45
With Caffeic acid / Com Ácido cafeico	1650 ± 50	12100 ± 50	13210 ± 35	14000 ± 25
With <i>p</i> -coumaric acid / Com Ácido <i>p</i> -cumárico	1600 ± 25	13200 ± 50	13350 ± 50	14500 ± 50

IL (without statistical difference). On the other hand, the formulations containing ILs presented a considerably higher viscosity when compared to the formulations without IL (Table 3), indicating the viscosity of the developed formulations is affected by presence of the ILs rather than the presence of each active. Moreover, recently our group showed that ILs can stabilize oil-in-water emulsions by increasing their viscosity (14), which is in accordance with what was observed in this study with the gel formulations. Thus, this present study not only reveals that choline-based ILs increase the viscosity of gel formulations, but reinforces that these materials may be an innovative choice to alter the fluidity and stability properties of different topical formulations.

Finally, as the studied drugs were incorporated at the maximum concentration that they are soluble in water or in each water:IL mixture (99.8:0.2 % w/w), it is also important to note that the ILs not only contributed for a lower fluidity, but also improved the drug loading compared to the aqueous gels prepared in the absence of the ILs. This is due to the higher drug solubility in the presence of the ILs.

Consequentemente, as viscosidades dos géis foram então avaliadas e os resultados obtidos reforçaram o que foi observado macroscopicamente (Figura 3), mostrando que a presença dos IL promoveu um aumento considerável na viscosidade das formulações. Além disso, a formulação de controlo - sem princípio ativo e sem LI - apresentou viscosidade semelhante às formulações contendo o princípio ativo, mas sem LI (sem diferenças estatísticas entre elas). Por outro lado, as formulações contendo LI apresentaram uma viscosidade consideravelmente maior, quando comparadas com formulações sem LI (Tabela 3), o que mostra que é a presença do LI que afeta a viscosidade das formulações desenvolvidas e não a presença de cada ativo. Além disso, recentemente o nosso grupo mostrou que os LI podem estabilizar as emulsões óleo/água aumentando a viscosidade (14), o que está de acordo com o que foi observado com as formulações deste gel. Assim, o presente estudo não só revela que os LI à base de colina aumentam a viscosidade das formulações em gel, mas reforça que estes materiais podem ser uma escolha inovadora para alterar as propriedades de fluidez e estabilidade de diferentes formulações tópicas.

Finalmente, como os princípios ativos estudados foram incorporados numa concentração que corresponde à máxima solubilidade em água ou em cada mistura de LI (99,8:0,2 % m/m), é importante mencionar que os LI não só contribuíram para uma menor fluidez, mas também permitiram aumentar a incorporação do princípio ativo, quando comparadas com géis aquosos preparados na ausência dos LI. Isso deve-se à maior solubilidade do fármaco na presença dos LI.

Conclusion

The results of the solubility studies carried out in this study showed that not only [Cho][Phe] and [Cho][Gly] may be used as solubility promoters of the studied phenolic compounds, but [Cho][Glu] also increases drug solubility by allowing a 2-fold drug solubility enhancement for *p*-coumaric acid and a 3-fold drug solubility enhancement for caffeic acid.

All the prepared gels were stable, showing that the ILs do not destabilize the formulations. Additionally, the developed gels in the presence of ILs presented a higher viscosity, a factor that may be considered in the formulation process and represent a new functionality of these salts in gel formulations.

Thus, in this study it was shown that choline-based ILs may be quite useful to enhance the drug loading of caffeic and *p*-coumaric acids into topical formulations, such as gels, and also shows that ILs may equally be used to alter the viscosity of topical systems, which may improve the consumer's acceptance of the product.

Authors Contributions Statement

TSA, conceptualization and study design; AJ and NR, experimental implementation; AJ, NR and TSA, data analysis; AJ, MN and TSA, drafting, editing and reviewing; AJ, figures and graphics; TSA, supervision; AJ, MN and TSA, final writing.

Funding

This study was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, through funding UIDB/0456/2020 and UIDP/04567/2020 (both general funding to CBIOS) as well as by funding from Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programme FIPID 2019/2020).

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationship that may present a potential conflict of interest.

Conclusão

Os resultados dos estudos de solubilidade realizados no âmbito deste estudo mostraram que não só o [Cho][Phe] e [Cho][Gly] podem ser usados como promotores de solubilidade dos compostos fenólicos estudados, mas o [Cho][Glu] também aumenta a solubilidade dos princípios ativos ao permitir um aumento da solubilidade para o dobro no caso do ácido *p*-cumárico e para o triplo no caso do ácido cafeico.

Todos os geles preparados permaneceram estáveis, mostrando que os LI não desestabilizam as formulações. Além disso, os géis desenvolvidos na presença de LI apresentaram maior viscosidade, fator que pode ser considerado no processo de formulação e representar uma nova funcionalidade desses sais em formulações gel.

Assim, neste estudo foi demonstrado que LI à base de colina podem ser bastante úteis para aumentar a incorporação de princípios ativos, como os ácidos cafeico e *p*-cumárico, em formulações tópicas, como géis, o que pode melhorar a aceitação do produto pelo consumidor.

Declaração sobre contribuições dos autores

TSA, conceptualização e desenho de estudos; AJ e NR, implementação experimental; AJ, NR e TSA, análise de dados; AJ, MN e TSA, elaboração, edição e revisão; AJ, figuras e gráficos; TSA, supervisão; AJ, MN e TSA, redação final.

Financiamento

Este estudo foi apoiado financeiramente pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do financiamento UIDB/0456/2020 e UIDP/04567/2020 (ambos com financiamento geral para o CBIOS), bem como pelo financiamento da Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programme FIPID 2019/2020).

Conflito de interesses

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

References / Referências

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- Sova, M., & Saso, L. (2020). Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. *Nutrients*, 12(8), 2190. <https://doi.org/10.3390/nu12082190>
- Caparica, R., Rolim Baby, A., Almeida, T.S., & Guilherme Costa, J. (2020). *In vitro* cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells, *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1), 63-74. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-17-1-2020/bbr.17.1.225.pdf>
- Coman, V., & Vodnar, D. C. (2020). Hydroxycinnamic acids and human health: recent advances. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(2), 483–499. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10010>
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international*, 2013, 251754. <https://doi.org/10.1155/2013/2517546>.
- Martinez, K. B., Mackert, J. D. and McIntosh, M. K. (2017) Polyphenols and intestinal health In R. R. Watson (Ed.), *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging* (Chapter 18., pp. 191-210) Academic Press.
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2017). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>.
- Nicolai, M., Mota, J., Fernandes, A. S., Pereira, F., Pereira, P., P Reis, C., Robles Velasco, M. V., Baby, A. R., Rosado, C., & Rijo, P. (2020). Assessment of the Potential Skin Application of *Plectranthus ecklonii* Benth. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(6), 120. <https://doi.org/10.3390/ph13060120>
- Peres, D. D., Ariede, M. B., Candido, T. M., de Almeida, T. S., Lourenço, F. R., Consiglieri, V. O., Kaneko, T. M., Velasco, M. V., & Baby, A. R. (2017). Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(2), 246–256. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1236809>
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & metabolism*, 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Kiokias, S., Proestos, C., & Oreopoulou, V. (2020). Phenolic Acids of Plant Origin-A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4), 534. <https://doi.org/10.3390/foods9040534>.
- Kim, E. O., Min, K. J., Kwon, T. K., Um, B. H., Moreau, R. A., & Choi, S. W. (2012). Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.011>
- Zhang, X., He, X., Chen, Q., Lu, J., Rapposelli, S., & Pi, R. (2018). A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(3), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.042>
- Caparica, R., Júlio, A., Fernandes, F., Araújo, M., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2021). Upgrading the Topical Delivery of Poorly Soluble Drugs Using Ionic Liquids as a Versatile Tool. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4338. <https://doi.org/10.3390/ijms22094338>
- Damascono, S. S., Dantas, B. B., Ribeiro-Filho, J., Antônio M Araújo, D., & Galberto M da Costa, J. (2017). Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Current pharmaceutical design*, 23(20), 3015–3023. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>
- Mota, F., Queimada, A.J., Pinho, S.P., & Macedo, E.A. (2008). Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 5182–5189.
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., Araújo, M., Fernandes, A. S., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2018). Choline-Amino Acid Ionic Liquids as Green Functional Excipients to Enhance Drug Solubility. *Pharmaceutics*, 10(4), 288. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288>
- Caparica, R., Júlio, A., Araújo, 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. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>
- 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. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1349788>
- Júlio, A., Antunes, C.D., Mineiro, R., Raposo, M., Caparica, R., M. Araújo, M.E., Rosado, C., Fonte, P., & Santos de Almeida, T. (2018). Influence of two choline-based ionic liquids on the solubility of caffeine. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1):96–102. <https://www.alies.pt/BBR%20Editions/Vol-15-1-2018/art9.pdf>
- Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D., Reis, S., Santos de Almeida, T., & Fonte, P. (2019). Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1148. <https://doi.org/10.3390/nano9081148>.
- Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., Almeida, T. V., & Araújo, M. E. (2014). Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere*, 104, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.055>
- Santos de Almeida, T., Júlio, A., Mota, J. P., Rijo, P., & Reis, C. P. (2017). An emerging integration between ionic liquids and nanotechnology: general uses and future prospects in drug delivery. *Therapeutic delivery*, 8(6), 461–473. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0002>
- Pedro S.N., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Freire, M.G. (2021) Ionic Liquids in Drug Delivery. *Encyclopedia*, 1(2):324-339. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1020027>
- Júlio, A., Sultane, A., Viana, A. S., Mota, J. P., & Santos de Almeida, T. (2021). Biobased Ionic Liquids as Multitalented Materials in Lipidic Drug Implants. *Pharmaceutics*, 13(8), 1163. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081163>
- Silva, W., Zanatta, M., Ferreira, A. S., Corvo, M. C., & Cabrita, E. J. (2020). Revisiting Ionic Liquid Structure-Property Relationship: A Critical Analysis. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7745. <https://doi.org/10.3390/ijms21207745>
- Ferraz, R., Silva, D., Dias, A. R., Dias, V., Santos, M. M., Pinheiro, L., Prudêncio, C., Noronha, J. P., Petrovski, Ž., & Branco, L. C. (2020). Synthesis and Antibacterial Activity of Ionic Liquids and Organic Salts Based on Penicillin G and Amoxicillin hydrolysate Derivatives against Resistant Bacteria. *Pharmaceutics*, 12(3), 221. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030221>.
- Pedro, S. N., R Freire, C. S., Silvestre, A., & Freire, M. G. (2020). The Role of Ionic Liquids in the Pharmaceutical Field: An Overview of Relevant Applications. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8298. <https://doi.org/10.3390/ijms21218298>.
- Siopa, F., Frade, R.F., Diniz, A.M., Andrade, J.M., Nicolai, M., Meirinhos, A.R., Lucas, S.D., Marcelo, F., Afonso, C.A., & Rijo, P. (2018). Acetylcholinesterase Choline-Based Ionic Liquid Inhibitors: In Vitro and in Silico Molecular Docking Studies. *ACS Omega*, 3(12):17145–54.
- Ali, M.K., Moshikur, R.M., Wakabayashi, R., Moniruzzaman, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2020). Biocompatible Ionic Liquid Surfactant-Based Microemulsion as a Potential Carrier for Sparingly Soluble Drugs. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 6263-6272.

31. Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D., Reis, S., Santos de Almeida, T., & Fonte, P. (2019). Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1148. <https://doi.org/10.3390/nano9081148>
32. Almeida, T.S., Júlio, A., Caparica, R., Rosado, C., Fernandes, A.S., Saraiva, N., Ribeiro, M., Araujo, M., Baby, A.R., Costa, J., & Mota, J.P. (2015). Ionic liquids as solubility/permeation enhancers for topical formulations: Skin permeation and cytotoxicity characterization. *Toxicology Letters*, 238.
33. Moshikur, R.M., Chowdhury, M.R., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2020). Biocompatible ionic liquids and their applications in pharmaceuticals. *Green Chemistry*, 22, 8116-8139.
34. Flory, P. J. (1974) Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57(1):7–18. <https://doi.org/10.1039/DC9745700007>
35. Marr, P.C., & Marr, A.C. (2016). Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry. *Green Chemistry*, 18, 105-128.
36. Sharadha, M., GowdaD, V., VishalGupta, N., & AkhilaA, R. (2020). An overview on topical drug delivery system – Updated review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11, 368-385.
37. Singh Malik, D., Mital, N., & Kaur, G. (2016). Topical drug delivery systems: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26, 213 - 228.
38. Das, B., Nayak, A.K., & Nanda, U. (2013). Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. *International journal of biological macromolecules*, 62, 514-7 .
39. Lee, J. A., & Nobles, W. L. (1959). Pharmaceutical applications of the sodium salt of carbopol 934. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 48(2), 92–94. <https://doi.org/10.1002/jps.3030480205>.
40. Chen, J., Zhou, R., Li, L., Li, B., Zhang, X., & Su, J. (2013). Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/ poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(10), 12415–12425. <https://doi.org/10.3390/molecules181012415>.
41. ANVISA - National Health Surveillance Agency. Cosmetic Products Stability Guide. Vol. 1. Brasilia, Brazil: ANVISA Publishing House; 2004.
42. Dervaux, J., & Amar, M. (2012). Mechanical Instabilities of Gels. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 3(1), 311-332.
43. Fontecha-Cámara, M. A., Álvarez, M. A., López-Ramón, V., & Moreno-Castilla, C. (2015). Fenton oxidation of gallic and p-coumaric acids in water assisted by an activated carbon cloth. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 71(5), 789–794. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.034>.
44. Calixto, L. S., Infante, V., & Maia Campos, P. (2018). Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1512–1519. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0960-0>.
45. Correa, N.M., Junior, F.B., Ignácio, R.F., & Leonardi, G.R. (2005). Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas*, 41, 73-78.

***Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil: Unraveling potential benefits on human skin**

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf óleo essencial: Desvendando potenciais benefícios na pele humana

Sérgio Faloni de Andrade ¹, Eucinário José Pinheiro ¹, Catarina Pereira-Leite ^{1,2}, Maria do Céu Costa ^{1,2}, Ana Cristina Figueiredo ³, Luis Monteiro Rodrigues ^{1*}

¹CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ²LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal; ³Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM Ciências), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), Biotecnologia Vegetal (BV), Departamento de Biologia Vegetal (DBV), Lisboa, Portugal

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

Abstract

The essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf is widely used for the production of fragrances, cosmetics, and detergents. However, there is no information on the effects of formulations containing *C. citratus* essential oil (EOCC) on human skin. This study aimed to evaluate the effects of formulation containing EOCC on human skin physiology. The study involved participants of both sexes (n=12). Two areas (3 cm x 3 cm) were drawn on both forearms. One randomly chosen area was treated for 14 days, 2 times/day with polyacrylic acid gel containing 5% EOCC and the other was used as a control for the same time period. Transepidermal water loss (TEWL), hydration, epidermal lipids, and biomechanics were measured (D0 and D14). High resolution Sonography images were also obtained. Results revealed a significant decrease in TEWL, a significant increase in hydration, firmness and elasticity, and a decrease in lipids, in the areas treated with EOCC. Sonography showed an increase in echogenicity of the epidermis after applying the formulation indicating that the essential oil penetrates only the most superficial layers of the skin. Results also suggest that formulations containing EOCC are safe for topical application and can improve and protect human skin.

Keywords: *Cymbopogon citratus*; essential oil; citral; lemongrass

Resumo

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf é amplamente utilizado para a produção de fragrâncias, cosméticos e detergentes. Entretanto, não há informações sobre os efeitos de formulações contendo óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na pele humana. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da formulação contendo EOCC na fisiologia da pele humana. O estudo envolveu participantes de ambos os sexos (n=12). Duas áreas (3 cm x 3 cm) foram desenhadas em ambos os antebraços. Uma área escolhida aleatoriamente foi tratada durante 14 dias, 2 vezes/dia com gel de ácido poliacrílico contendo 5% de EOCC e a outra foi utilizada como controlo durante o mesmo período de tempo. Foram medidas perdas de água transepidermica (PTEA), hidratação, lípidos epidérmicos, e biomecânica (D0 e D14). Foram também obtidas imagens de sonografia de alta resolução. Os resultados revelaram uma diminuição significativa na PTEA, um aumento significativo na hidratação, firmeza e elasticidade, e uma diminuição nos lípidos, nas áreas tratadas com EOCC. A sonografia mostrou um aumento da ecogenicidade da epiderme após a aplicação da formulação, indicando que o óleo essencial penetra apenas as camadas mais superficiais da pele. Os resultados também sugerem que as formulações contendo EOCC são seguras para aplicação tópica e podem melhorar e proteger a pele humana.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*; óleo essencial; citral; capim-limão; erva-príncipe

Introduction

Currently, there is a great interest in natural products that might benefit human skin physiology. Many essential oils have been indicated as potentially interesting by combining beneficial effects on the skin while providing pleasant organoleptic properties to formulations. In addition, some essential oils have been used in traditional medicine for over 5,000 years, with many purposes, including anti-inflammatory, analgesic, antifungal, antimicrobial, antioxidant (1,2) and also to prevent skin aging (3,4). Due to their lipid characteristics, certain essential oils might be interesting for the treatment of cutaneous xerosis, a common condition in the elderly characterized by excessively dry skin resulting from an imbalance of lipids in the most superficial layer of the skin (5,6).

However, there are uncertainties about the safety of these products, as irritation, sensitivity, and contact dermatitis have been reported in human skin (7-9). It is important to point out that most efficacy and safety studies about the application of essential oils on the skin have been conducted *in vitro* (using skin cell lines) or in animal models, using multiple methodologies which are difficult to compare or extrapolate to human. Thus, the scarcity of studies on humans has limited the potential use of essential oils as effective and safe phytotherapeutic agents. Further studies are needed to verify the efficacy and safety of these products (3,10).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, commonly known as lemongrass, is an important medicinal plant cultivated in different regions of the world, including Portugal. Its essential oil, whose principal component is the monoterpene citral, is widely used to produce fragrances, cosmetics, detergents, and pharmaceutical products (11,12). However, there is no scientifically-based information on the effects of formulations containing *C. citratus* essential oil (EOCC) on human skin. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of a formulation containing EOCC on the skin physiology of healthy volunteers

Introdução

Atualmente, existe um grande interesse em produtos naturais que possam beneficiar a fisiologia da pele humana. Muitos óleos essenciais têm sido apontados como potencialmente interessantes, combinando efeitos benéficos sobre a pele ao mesmo tempo que proporcionam características organolépticas agradáveis às formulações. Além disso, muitos destes têm sido utilizados na medicina tradicional há mais de 5.000 anos com muitos propósitos - anti-inflamatórios, analgésicos, antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes (1,2) também para prevenir o envelhecimento da pele (3,4). Devido à sua característica lipídica, estes podem ser interessantes para o tratamento da xerose cutânea, uma condição comum nos idosos caracterizada por uma pele excessivamente seca resultante de um desequilíbrio de lípidos na camada mais superficial da pele (5,6).

No entanto, existem incertezas sobre a segurança destes produtos, uma vez que foram relatadas irritações, sensibilidade e dermatites de contacto na pele humana (7-9). É importante salientar que a maioria dos estudos de eficácia e segurança sobre a aplicação de óleos essenciais na pele foram realizados *in vitro* (utilizando linhas de células cutâneas) ou em modelos animais, utilizando múltiplas metodologias difíceis de comparar ou extrapolar para o ser humano. Assim, a escassez de estudos sobre seres humanos limita a potencial utilização de óleos essenciais como agentes fitoterapêuticos eficazes e seguros. Isto significa também que são necessários mais estudos para verificar a eficácia e a segurança destes produtos (3,10).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, comumente conhecida como capim-limão, é uma importante planta medicinal cultivada em diferentes regiões do mundo, incluindo Portugal. O seu óleo essencial, cuja substância principal é o monoterpene citral, é amplamente utilizado para produzir fragrâncias, cosméticos, detergentes, e produtos farmacêuticos (11,12). No entanto, não existe informação científica em os efeitos das formulações contendo óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na pele humana. Por conseguinte, o objetivo deste estudo era avaliar os efeitos de uma formulação contendo EOCC sobre a fisiologia da pele de voluntários saudáveis.

Table 1 - Quantitative composition of EOCC-containing gel.**Tabela 1**- Composição quantitativa do gel contendo EOCC.

Component / Componente	Quantity (% w/w) / Quantidade (% m/m)
EOCC / EOCC	5
Carbopol® 940 / Carbopol® 940	1
Glycerin / Glicerina	5
Ethylenediamine tetraacetic acid / ácido etilenodiamino tetra-acético	0.1
Paraben preservative solution / Solução de parabenos	3.3
Triethanolamine / Trietanolamina	q.s. to pH 4.6 ± 0.1
Distilled water / Água Destilada	q.s. to 100

EOCC: Essential oil of *Cymbopogon citratus*; q.s.: quantum satis / EOCC: Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; q.s.: quantum satis

Material and Methods

Formulation

The essential oil obtained from aerial parts of *Cymbopogon citratus* was provided by "Cantinho das Aromáticas" (Lisbon, Portugal). The quantitative composition of the EOCC-containing gel is presented in Table 1. EOCC, glycerin (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), disodium ethylenediaminetetraacetate (Saninter, Lisboa, Portugal), and a paraben preservative solution, made of methylparaben (6% w/w, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) and propylparaben (3% w/w, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) in propylene glycol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal), were mixed. The polymer (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was dispersed in distilled water and then allowed to hydrate and swell before the addition of the previously prepared mixture. Triethanolamine (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was added under stirring until a viscous and homogeneous gel was obtained with a pH value of 4.6 ± 0.1. A control gel, in the absence of EOCC, was similarly prepared without the addition of the essential oil.

Chemical characterization

The essential oil was characterized by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). GC analysis was performed using a Perkin Elmer Clarus 400 Gas Chromatograph equipped with two Flame Ionization Detectors (FID), a split-splitless injector (split ratio of 1:40), and data processing system. Two

Material e Métodos

Formulação

O óleo essencial obtido das partes aéreas de *Cymbopogon citratus* foi fornecido pela Empresa "Cantinho das Aromáticas" (Lisboa, Portugal). A composição quantitativa do gel contendo EOCC é apresentada na Tabela 1. Para obtenção do gel foi feita uma mistura de EOCC, glicerina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), etilenodiaminotetraacetato dissódico (Saninter, Lisboa, Portugal) e solução conservante de parabenos, à base de metilparabeno (6% m/m, AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemanha) e propilparabeno (3% m/m, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) em propilenoglicol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal). O polímero (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) foi disperso em água destilada e após intumescimento deste foi adicionado a mistura previamente preparada e adicionado trietanolamina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) sob agitação até obter um gel viscoso e homogêneo com valor de pH de 4,6 ± 0,1. Um gel controle, sem EOCC, foi preparado de forma semelhante sem a adição do óleo essencial.

Caracterização química

O óleo essencial foi caracterizado por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS). A análise por cromatografia gasosa (GC) foi realizada usando um cromatógrafo a gás Perkin Elmer Clarus 400 equipado com dois detectores de ionização de chama (FID), um injetor split-splitless (razão de split de 1:40) e

columns of different polarity were used (i) DB-1 fused-silica capillary column coated with 100% polydimethylsiloxane [(30 m x 0.25 mm, 0.25 µm thickness); J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, USA] and (ii) DB-7HT fused-silica capillary column coated with phenylmethylsilicone [(50% phenyl)- methylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm, 0.15 µm thickness) J&W Scientific Inc.]. The oven temperature was programmed to increase from 45°C to 175°C at 3°C/min, and subsequently at 15°C/min until 300°C, at which time the temperature was held (isothermal) for 10 min. The total run time was 61 min. Hydrogen was used as carrier gas, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s. The temperatures of the injector and detector were kept at 280°C and 290°C, respectively. The injection volume of essential oil was approximately 0.01 µL. The percentage composition of essential oil was determined by the normalization method, without using correction factors, according to ISO 7609. Values presented correspond to the mean value of two injections.

GC-MS analysis was performed on a Clarus 600T Mass Spectrometer equipped with a DB-1 fused silica column [(100% polydimethylsiloxane, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm thickness) J & W Scientific Inc.] connected to a Perkin-Elmer Turbomass (program version 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). The oven temperature was programmed from 45°C to 175 °C, in increments of 3 °C/min, and subsequently at 15 °C/min until 300 °C, at which time the temperature was kept isothermal for 10 min. The injector temperature was 280°C, the transfer line temperature was 280 °C, and the ionization chamber temperature was 220°C. Helium was used as carrier gas, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s, with a flow sharing ratio of 1:40. The ionization energy was 70 eV, ionization current 60 µA, collecting over a mass range of 40-300 a.m.u. with a 1 s scan time. The identity of the compounds was determined by comparing their retention rates, in relation to those of the n-alkanes and mass spectra, with standards synthesized in the laboratory, commercial standards, and by comparison with a library of mass spectra also developed in the laboratory.

Experimental design

The study included 12 healthy participants (8 women and 4 men; mean age 36.2 ± 16.3 years old) without any skin or other systemic diseases. Volunteers received a detailed explanation of the study and provided

o sistema de processamento de dados. Foram utilizadas duas colunas de diferentes polaridades: i) Coluna capilar DB-1 de sílica fundida revestida com 100% polidimetilsiloxano [(30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura); J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, EUA]; ii) Coluna capilar de sílica fundida DB-7HT revestida com fenilmetilsilicone [(50% fenil)-metilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,15 µm de espessura) J&W Scientific Inc.]. A temperatura do forno foi programada para subir de 45°C para 175°C a 3°C/min, e posteriormente a 15°C/min até 300°C. Uma vez atingidos 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica por 10 min, totalizando um tempo de corrida de 61 min. Hidrogênio foi usado como gás de arraste ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 280°C e 290°C, respectivamente. O volume de injeção do óleo essencial foi de 0,01µL. A composição percentual do óleo essencial foi determinada pelo método de normalização, sem uso de fatores de correção, conforme ISO 7609. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

A análise por GC-MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massa Clarus 600T equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 [(100% polidimetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura) J & W Scientific Inc.] conectado ao Perkin-Elmer Turbomass (versão do programa 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, em incrementos de 3°C/min, e posteriormente a 15°C/min até 300°C. Ao atingir 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica por 10 min. Temperatura do injetor e da linha de transferência foi de 280°C e a temperatura da câmara de ionização de 220°C. Gás Hélio foi usado como gás de arraste ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s, com uma razão de compartilhamento de fluxo 1:40. A energia de ionização foi 70 eV, corrente de ionização 60 µA, recolhida num intervalo de massa de 40-300 a.m.u. com um tempo de varredura de 1 s. A identidade dos compostos foi determinada comparando suas taxas de retenção, em relação às dos n-alcenos e espectros de massa, com padrões sintetizados no laboratório, padrões comerciais e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa também desenvolvida no laboratório.

Desenho experimental

O estudo foi realizado com 12 participantes saudáveis (8 mulheres e 4 homens; idade média de 36,2 ± 16,3 anos) sem doenças de pele ou outras doenças

written informed consent. All procedures observed the principles of good clinical practice from the Helsinki Declaration and respective amendments (13) and were previously approved by the institution's Ethics Committee (approval number 04/13).

A primary cutaneous tolerance assay using the 'open-test' methodology was performed (14) for 24h before the experiments.

For the efficacy test, two areas (3 cm x 3 cm) were marked in both forearms. Applications were randomized. The trial was designed for 14 days with standardized applications (0.1 mL) using a syringe two times a day (morning and evening) at home. The formulation containing EOCC was applied in one area and the control gel (without EOCC) in the other. The study was single-blinded.

Skin functions were assessed before application of the products (D0) and at the end of the trial (D15), assessing transepidermal water loss (TEWL, Tewameter® CK electronics, Germany) a measure of the epidermal "barrier" (15), the superficial and deep hydration of the epidermis (Moisturemeter SC and Moisturemeter® Dtec, Finland) (16), the biomechanical behaviour of the skin (Cutiscan® CK electronics, Germany) expressed in terms of firmness (V1) and elasticity (V3) (17) and the assessment of skin lipids (Sebumeter SM 815, CK electronics, Germany) (18). High resolution ultrasound images (HRS, DermaScan C Cortex Technology, Denmark) were obtained at D0 and D15) (19). The color images were converted into a grey scale image for further analysis processed by software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, USA) (19). All data were obtained in a controlled environment (humidity ~ 50%, temperature 21 ± 2 °C) and participants were acclimatized for at least 30 min before starting the tests. During the study period, subjects were instructed to not apply detergents, emollients, moisturizers, or any cosmetics in the testing areas.

sistêmicas. Os voluntários receberam uma explicação detalhada do estudo e forneceram consentimento informado por escrito. Todos os procedimentos respeitaram os princípios de boa prática clínica da Declaração de Helsínquia e respetivas alterações (13) e foram aprovados pela Comissão de Ética (aprovação n.º 04/13).

A tolerância dermatológica da formulação a testar foi previamente avaliada por teste de contacto aberto (open test) (14) durante 24 horas.

Para os testes *in vivo*, foram desenhadas duas áreas (3 cm x 3 cm) no mesmo antebraço dos voluntários e as aplicações foram feitas de forma randomizada. O ensaio foi desenhado para 14 dias com aplicações padronizadas (0,1 mL da formulação) usando uma seringa 2 vezes ao dia (manhã e noite) no domicílio dos voluntários. Numa área a formulação contendo EOCC foi aplicada enquanto na outra área apenas o gel de controlo (sem EOCC). O estudo foi feito de modo mono-cego.

As funções cutâneas foram avaliadas antes da aplicação dos produtos (D0) e no final do ensaio (D15) envolvendo a medição da perda transepidermica de água (TEWL, Tewameter® CK electronics, Alemanha) uma medida da "barreira" epidérmica (15), a hidratação superficial e profunda da epiderme (Moisturemeter SC e Moisturemeter® Dtec, Finlândia) (16), o comportamento biomecânico da pele (Cutiscan® CK electronics, Alemanha) expresso em termos de firmeza (V1) e elasticidade (V3) (17) e a avaliação dos lípidos cutâneos (Sebumeter SM 815, CK electronics, Alemanha) (18). Imagens de ultrassonografia de alta resolução (HRS, DermaScan C Cortex Twechnology, Dinamarca) foram obtidas em D0 e D15). As imagens coloridas foram convertidas em imagens em escala de cinza para posterior análise e processamento usando o Software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) (19). Todos os dados foram obtidos em ambiente com umidade e temperatura controlada (umidade ~ 50%, temperatura 21 ± 2 °C) e os participantes foram aclimatados por pelo menos 30 minutos antes de iniciar o procedimento. e analisadas usando Image J® Software (NIH, Bethesda, Maryland, USA) (19). Todos os dados foram obtidos em ambiente com umidade e temperatura controladas (umidade ~ 50%, temperatura 21 ± 2 °C) e os participantes foram aclimatados por pelo menos 30 min antes de iniciar o procedimento. Durante o período do estudo, os sujeitos foram orientados a não aplicar detergents, emolientes, hidratantes ou quaisquer cosméticos nos braços.

Statistics

Data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM) and compared by Mann–Whitney test using GraphPadPrism 5[®] software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *p* value <0.05 was considered significant.

Results

The chromatographic analysis of the EOCC allowed the identification of 24 compounds, accounting for 96.1% of the total oil. The main components identified in the essential oil were geranial (*trans*-citral) (42.3%) and neral (*cis*-citral) (33.2%). These data are summarized in Table 2.

Estatística

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

Resultados

A análise cromatográfica do EOCC permitiu identificar 24 compostos, os quais constituem 96,1% do óleo total. Os principais componentes identificados no óleo essencial foram geranial (*trans*-citral) (42,3%) e neral (*cis*-citral) (33,2%). Estes dados estão resumidos na Tabela 2.

Table 2 - Chemical composition of Essential oil from *Cymbopogon citratus*.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Compound / Compostos	RI / IR	Percentage / Porcentagem
<i>trans</i> -limonene oxide / óxido de <i>trans</i> -limoneno	1112	0.2
Borneol/Borneol	1134	0.1
<i>cis</i> -Crisantemol / <i>cis</i> -Crisantemol*	1151	0.8
α -Terpineol / α -Terpineol	1159	0.2
<i>trans</i> -Carveol / <i>trans</i> -Carveol/	1189	v
Neral (<i>cis</i> -Citral) / Neral (<i>cis</i> -Citral)/	1210	33.2
Piperitone / Piperitona	1211	0.1
Geraniol / Geraniol	1236	5.4
Geranial (<i>trans</i> -Citral) / Geranial (<i>trans</i> -Citral)	1240	42.3
Geranyl formate / Formato de Geranil	1285	tr
Methyl geranate* / Geranato de metila	1288	tr
α -Cubebene / α -Cubebeno	1345	tr
Geranyl acetate / Acetato de Geranil	1370	3.2
β -Elemene / β -Elemeno	1388	tr
β - Caryophyllene / β - Caryophylleno	1414	1.4
<i>trans</i> -Isoeugenol / <i>trans</i> -Isoeugenol	1422	0.1
β -Copaene / β -Copaeno	1426	0.1
α -Humulene / α -Humuleno	1446	0.2
<i>trans</i> -Cadina-1(6)-4-diene / <i>trans</i> -Cadina-1(6)-4-dieno	1469	tr
Germacrene D / Germacreno D	1474	0.1
α -Muurolene / α -Muuroleno	1494	tr
γ -Cadinene / γ -Cadineno	1500	1.3
δ -Cadinene / δ -Cadineno	1505	0.2
β - Caryophyllene oxide / Óxido de Cariofileno	1561	tr
% Identification / % Identificação		96.1

RI: Retention Index relative to a series of C9-C16 n-alkanes; tr: trace (<0.05%); *Compound identified based only on mass spectrum.
 IR: índice de retenção relative a série de C9-C16 n-alcenos; tr: traço (<0.05%); *Composto identificado com base no espectro de massa

Table 3 - Transepidermal Water Loss, epidermal hydration, and sebum before and after application of the formulation containing EOCC for 14 days.**Tabela 3** - Perda de água transepidérmica, hidratação epidérmica e sebo antes e após a aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

	Site 1 (control) / Site 1 (controle)		Site 2 (treated) / Site 2 (tratado)	
	Before/Antes	After/Depois	Before/Antes	After/Depois
TEWL (g/m ² /h) / PTEA (g/m ² /h)	5.22 ± 0.46	5.82 ± 0.48	5.69 ± 0.44	4.38 ± 0.38*
Hydration SC (A.U.) / Hidratação SC (U.A.)	29.48 ± 1.61	29.22 ± 2.73	28.99 ± 1.23	35.34 ± 2.25*
Hydration Deep (A.U.) / Hidratação Profunda (U.A.)	27.04 ± 2.63	29.16 ± 1.22	26.71 ± 1.82	35.18 ± 1.54**
Cutaneous lipids (A.U.) / Lipídeos cutâneos (U.A.)	0.93 ± 0.13	0.85 ± 0.20	1.05 ± 0.23	0.40 ± 0.13*

*p < 0.05; **p < 0.01, Mann-Whitney test / *p < 0.05; **p < 0.01, Teste Mann-Whitney

The open skin tolerance test indicated that the formulation containing EOCC was well tolerated. No signs of irritation, such as erythema, dryness, edema, or itching, were observed. At any time during the 14-day treatment period.

Regarding skin parameters, a significant decrease in TEWL was observed in the site treated with the formulation containing EOCC, as well as a significant increase in superficial and deep epidermal hydration and a decrease in skin lipids (Table 3). Comparing skin biomechanical parameters revealed an increase in V1 (firmness) and V3 (elasticity) relative to the control gel (Table 4).

The High-Resolution Sonography has shown that the epidermis was more echogenic after applying the EOCC formulation, suggesting that essential oil penetrates the most superficial layers of the skin (Table 5, Figure 1).

O teste aberto de tolerância da pele revelou que a formulação contendo EOCC foi bem tolerada e não foram observados sinais de irritação, como eritema, ressecamento, edema ou prurido. Além disso, não foram observados sinais de irritação durante os 14 dias de tratamento.

Relativamente aos parâmetros cutâneos, no local tratado com a formulação contendo EOCC observou-se uma diminuição significativa em TEWL, bem como um aumento significativo na hidratação superficial e profunda da epiderme e uma diminuição dos lípidos da pele (Tabela 3). Os parâmetros biomecânicos da pele revelaram um aumento em V1 (firmeza) e V3 (elasticidade) (Tabela 4).

A Sonografia de Alta Resolução mostrou que a epiderme era mais ecogénica após a aplicação da formulação EOCC, sugerindo que o óleo essencial penetra nas camadas mais superficiais da pele (Tabela 5, Figura 1).

Table 4 - Biomechanical skin parameters before and after application of the formulation containing EOCC for 14 days.

Tabela 4 - Parâmetros biomecânicos da pele antes e após a aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

Biomechanical parameters / Parâmetros Biomecânicos	Site 1 (control) / Site 1 (controle)		Site 2 (treated) / Site 2 (tratado)	
	Before/Antes	After/Depois	Before/Antes	After/Depois
V1 (firmness) / V1 (firmeza)	59.16 ± 6.18	61.18 ± 9.43	67.46 ± 6.92	44.81 ± 3.97*
V2 (viscoelasticity) / V2 (viscoelasticidade)	12.34 ± 2.96	7.85 ± 2.36	13.24 ± 3.76	15.29 ± 2.90
V3 (elasticity) / V3 (elasticidade)	21.77 ± 6.31	18.44 ± 5.34	17.95 ± 4.10	39.25 ± 7.04*

*p < 0.05, Mann-Whitney test / *p < 0,05 Teste Mann-Whitney

Table 5 - Variation in the epidermal echogenicity after application of the formulation containing EOCC for 14 days.

Tabela 5 - Variação da ecogenicidade epidérmica após aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

	Epidermis Echogenic area (%) / Área ecogênica da epiderme (%)
Site 1 (control)% / Site 1 (controle)%	16.28 ± 1.70
Site 2 (EOCC treated) / Site 2 (tratado)	25.72 ± 1.60*

*p < 0.05, Mann-Whitney test / *p < 0,05 Teste Mann-Whitney

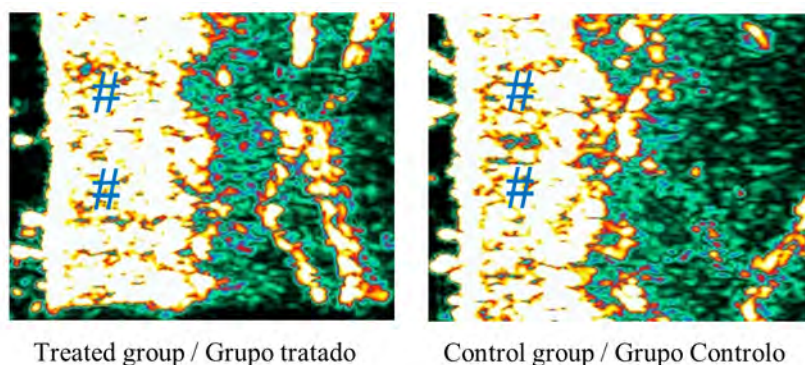


Figure 1 - Illustrative ultrasound image showing increase in epidermis echogenicity area (bright area) after the application of essential oil formulation. ## Epidermis.

Figura 1 - Imagem sonográfica ilustrativa mostrando o aumento da área de ecogenicidade da epiderme (área brilhante) após a aplicação da formulação do óleo essencial. ## Epiderme.

Discussion

In this study we investigated effects of *C. citratus* essential oil (EOCC) on skin physiology to evaluate its potential interest for use in skin care formulations. EOCC has been reported to have several benefits, including topical anti-inflammatory, antifungal (20), anxiolytic (21), anti-ulcer (22), and antihypertensive (23) effects. The main component of EOCC is the monoterpene citral, which can be found in two isomeric forms (*cis*, known as neral; or *trans*, known as geranial) (11, 24) and to which most of the beneficial effects of EOCC have been attributed (25). Chemical analysis of the essential oil used in this work revealed mostly citral in its composition. Lulekal et al. (26) reported no skin irritant effect and no systemic toxicity when a formulation containing 10% EOCC was administered to mice, suggesting that this essential oil has a good safety profile. We evaluated the safety of our formulation, which contained a lower concentration of EOCC, in human skin through the "open test" methodology. No signs of irritation or toxicity were observed after application, allowing the continuation of the experimental efficacy protocol.

Our results have shown that the application of the formulation containing EOCC significantly increased the epidermis superficial and deep hydration ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and reduced the transepidermal water loss (TEWL) ($p < 0.05$). Water is essential for normal skin functionality, especially its outermost layer, the stratum corneum (SC). Water retention in the SC is dependent on the presence of two main factors (1) naturally occurring hygroscopic substances collectively referred to as natural moisturizing factors (NMFs), and (2) intercellular lipids organized to form a barrier that prevents transepidermal water loss (TEWL) (27). Sufficient hydration of the epidermis is necessary for the proper maturation of the EC and physiological peeling of the skin. Thus, if the water content in the epidermis falls below a critical level the enzymatic functions required for physiological peeling are impaired, and excessive adhesion of corneocytes occurs with their accumulation on the skin surface. This process leads to the appearance of dry, rough, and flaking skin (28). The inverse correlation between TEWL and skin hydration has been well demonstrated, as higher levels of TEWL, a marker of skin barrier function, are often correlated with lower water content

Discussão

Neste estudo, investigamos os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na fisiologia da pele tendo em mente o seu potencial interesse para utilização em formulações de cuidados com a pele. Foi relatado que o EOCC tem vários efeitos benéficos tais como anti-inflamatório tópico, antifúngico (20), ansiolítico (21), anti-úlceras (22), e anti-hipertensivo (23). O principal componente do EOCC é o monoterpene citral que pode ser encontrado em duas formas isoméricas (*cis*, conhecido como neral; ou *trans*, conhecido como geranial) (11, 24) e ao qual foi atribuída a maioria dos efeitos benéficos do EOCC (25). A análise química do óleo essencial utilizado neste trabalho revelou, na sua composição, sobretudo citral. Lulekal et al. (26) não reportaram qualquer efeito irritante na pele e nenhuma toxicidade sistêmica quando uma formulação contendo 10% de EOCC foi administrada a ratos, sugerindo que este óleo essencial tem um bom perfil de segurança. Avaliámos a segurança da nossa formulação na pele humana, que continha uma menor concentração de EOCC, através da metodologia do "teste aberto". Não foram observados sinais de irritação ou toxicidade após a aplicação, o que permitiu a continuação do protocolo de eficácia experimental.

Nossos resultados mostraram que a aplicação da formulação contendo EOCC aumentou significativamente a hidratação superficial e profunda da epiderme ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e reduziu a perda de água transepidérmica (TEWL) ($p < 0,05$). A água é essencial para a funcionalidade normal da pele, especialmente para a sua camada mais externa, o stratum corneum (SC). A retenção de água na SC está dependente da presença de dois factores principais (1) substâncias higroscópicas naturais colectivamente referidas como factores hidratantes naturais (NMFs), e (2) lípidos intercelulares organizados para formar uma barreira que previne a perda de água transepidérmica (PTEA) (27). É necessária uma hidratação suficiente da epiderme para a maturação adequada da SC e peeling fisiológico da pele. Assim, se o conteúdo de água na epiderme cair abaixo de um nível crítico, as funções enzimáticas necessárias para o peeling fisiológico são prejudicadas, e ocorre uma adesão excessiva dos corneócitos com a sua acumulação na superfície da pele. Este processo leva ao aparecimento de pele seca, áspera e descamação da pele (28). A correlação inversa entre a PTEA e a hidratação cutânea foi bem demonstrada, uma vez que níveis mais elevados de PTEA, um marcador da função de barreira cutânea, estão frequentemente correlacionados com um menor

in the SC (29). Thus, the results regarding TEWL and hydration suggest that the formulation containing EOCC improves the water balance in the skin, among other factors, by increasing the barrier function of the skin leading to decreased TEWL and increasing the water content of the epidermis.

The image analysis obtained by High Resolution Sonography showed that the formulation containing EOCC significantly increases the epidermis echogenicity ($p < 0.05$), suggesting that the formulation is retained mainly in this layer of the skin, which corroborates the evidence that the lipidic character of the essential oil could combine with the lipids of the SC and increase the integrity of this structure, thus providing greater barrier integrity with a consequent decrease in TEWL. In addition, the permanence of the oil in the epidermal layer is evidence of their safety, as their effects would be restricted to the skin. Similar results have recently been described by our research group with formulations containing essential oils of *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavender) and *Salvia officinalis* L. (Sage) (30).

The biomechanical properties of the skin were evaluated using CutiScan®. A significant decrease in V1 values ($p < 0.05$) and an increase in V3 values ($p < 0.05$) were observed at the site exposed to the formulation containing EOCC. V1 is related to the firmness and seems to indicate the ability of the skin to resist displacement; the firmer the skin, the lower the V1. V3 has been related to the ability of the skin to resist displacement versus its ability to return to its original position; the higher the V3, the better the elasticity (17,31). Skin firmness is related to the ability of collagen and elastic fibers to elongate and is inversely proportional to their thickness and rigidity (32). Elasticity is considered an indicator of age and overall skin health (33) and is also related to the content of collagen and elastin fibers (34,35). Thus, our results suggest that the application of the formulation containing EOCC favors the accumulation of these protein fibers in the skin and improves its biomechanical characteristics.

teor de água no SC (29). Assim, os resultados relativos à PTEA e à hidratação sugerem que a formulação contendo EOCC melhora o equilíbrio da água na pele, entre outros factores, aumentando a função de barreira da pele levando à diminuição da TEWL e aumentando o conteúdo de água da epiderme.

A análise de imagem proporcionada pela Sonografia de Alta Resolução mostrou que a formulação contendo EOCC aumenta significativamente a ecogenicidade da epiderme ($p < 0,05$), sugerindo que a formulação é retida principalmente nesta camada da pele, o que corrobora a evidência de que o óleo essencial pelo seu carácter lipídico poderia combinar-se com os lípidos do SC e aumentar a integridade desta estrutura, proporcionando assim uma maior integridade da barreira com uma consequente diminuição do PTEA. Além disso, a permanência do óleo na camada epidérmica evidencia a sua segurança, uma vez que os seus efeitos ficariam restritos à pele. Resultados semelhantes foram recentemente descritos pelo nosso grupo de investigação com formulações contendo óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavandula) e *Salvia officinalis* L. (Sage) (30).

As propriedades biomecânicas da pele foram avaliadas através do CutiScan®. Foram observados a diminuição significativa dos valores de V1 ($p < 0,05$) e aumento significativo dos valores de V3 ($p < 0,05$) no sítio exposto à formulação contendo EOCC. V1 está relacionado com a firmeza e parece indicar a capacidade da pele de resistir ao deslocamento; quanto mais firme é a pele, mais baixa é a V1. V3 tem estado relacionado com a capacidade da pele de resistir ao deslocamento versus a sua capacidade de voltar à sua posição original; quanto mais alto o V3, melhor a elasticidade (17,31). A firmeza da pele está relacionada com a capacidade de alongamento das fibras elásticas e de colagénio e é inversamente proporcional à sua espessura e rigidez (32). A elasticidade é considerada um indicador de idade e saúde geral da pele (33) e está também relacionada com o conteúdo das fibras de colagénio e elastina (34,35). Assim, os nossos resultados sugerem que a aplicação da formulação contendo EOCC é capaz de favorecer a acumulação destas fibras proteicas na pele e melhorar as suas características biomecânicas.

Finally, the repeated use of the formulation did not increase the lipid content of the epidermal surface. However, it is possible to speculate about the potential enhancement of these compounds on epidermal cohesion, as suggested by the previously detected effects (30,36). Regardless, there appears to be a consistent decrease in epidermal lipid content ($p < 0.05$) after repeated exposure to the EOCC-containing formulation. This additional aspect would reinforce the interest in using these compounds in skin health products (37).

Acknowledgments

This work is funded by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., under projects UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020 and UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+LA/P/0094/2020.

Authors contribution

SFA, EP, MCC, LMR planned and performed experiments; CPL prepared the formulations; ACF has undertaken Chromatographic analysis; SFA and LMR wrote and corrected the manuscript.

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.

Finalmente, o uso repetido da formulação não aumentou o conteúdo lipídico da superfície epidérmica. No entanto, é possível especular sobre o potencial aumento destes compostos na coesão epidérmica, como sugerido pelos efeitos previamente detectados (30,36). Mas mesmo assim, parece haver uma diminuição consistente no teor de lípidos epidérmicos ($p < 0,05$) após exposição repetida à formulação contendo EOCC. Este aspecto adicional reforçaria o interesse na utilização destes compostos em produtos para a saúde da pele (37).

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020 e UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+LA/P/0094/2020.

Declaração de contribuições dos autores

SFA, EP, MCC, LMR planejaram e realizaram experimentos; CPL preparou as formulações; ACF realizou as análises cromatográficas; SFA e LMR redigiram e corrigiram o manuscrito.

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. Guzmán, E., & Lucia, A. (2021). Essential Oils and Their Individual Components in Cosmetic Products. *Cosmetics*, 8(4), 114. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>
2. Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
3. Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M., Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S., & Iriti, M. (2017). Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*, 22(1), 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
4. Orchard, A., & van Vuuren, S. (2017). Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–92. <https://doi.org/10.1155/2017/4517971>
5. Augustin, M., Wilsmann-Theis, D., Körber, A., Kerscher, M., Itschert, G., Dippel, M., & Staubach, P. (2019). Diagnosis and treatment of xerosis cutis – a position paper. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 17(S7), 3–33. <https://doi.org/10.1111/ddg.13906>
6. Rosário, M. S. d., Gauto, M. I. R., Silva, A. C. L. N., Sales, J. S., Pereira, F. d. S., Santos, E. P. d., Júnior, E. R., & Costa, M. C. P. (2021). Estudo de estabilidade de emulsão cosmética com potencial de creme hidratante para o tratamento da xerose cutânea utilizando o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius)/ Study of stability of cosmetic emulsion with potential of hydrating cream for the treatment of cutaneous xerosis using babassu oil (*Orbignya phalerata* Martius). *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 29552–29570. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-596>
7. Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011>
8. Plant, R. M., Dinh, L., Argo, S., & Shah, M. (2019). The Essentials of Essential Oils. *Advances in Pediatrics*, 66, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.03.005>
9. Fuentes, C., Fuentes, A., Barat, J. M., & Ruiz, M. J. (2021). Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(8), 559–565. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1940408>
10. Maurya, A. K., Mohanty, S., Pal, A., Chanotiya, C. S., & Bawankule, D. U. (2018). The essential oil from *Citrus limetta* Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.018>
11. Ekpenyong, C. E., Akpan, E., & Nyoh, A. (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(5), 321–337. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(15\)30023-6](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(15)30023-6)
12. Majewska, E., Kozłowska, M., Gruczyńska-Sękowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 327–341. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113152>
13. World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
14. Meloni, M., & Berardesca, E. (2001). The Impact of COLIPA Guidelines for Assessment of Skin Compatibility on the Development of Cosmetic Products. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(2), 65–68. <https://doi.org/10.2165/00128071-200102020-00002>
15. Pinnagoda, J., Tupkek, R. A., Agner, T., & Serup, J. (1990). Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*, 22(3), 164–178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1990.tb01553.x>
16. Mayrovitz, H. N., & Luis, M. (2010). Spatial variations in forearm skin tissue dielectric constant. *Skin Research and Technology*, 16(4), 438–443. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2010.00456.x>
17. Rosado, C., Barbosa, R., Fernando, R., Antunes, F., & Rodrigues, L. M. (2015). Study of the effect of epidermal overhydration by occlusion, on the skin biomechanical behaviour assessed *in vivo* with the systems Cutometer®, Reviscometer® and CutiScan®. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(2), 203–213. <https://doi.org/10.19277/bbr.12.2.117>
18. Crowther, J. M. (2015). Method for quantification of oils and sebum levels on skin using the Sebumeter®. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(2), 210–216. <https://doi.org/10.1111/ics.12258>
19. Seidenari, S., Nakijo, A. D., Pepe, P., & Giannetti, A. (1991). Ultrasound B scanning with image analysis for assessment of allergic patch test reactions. *Contact Dermatitis*, 24(3), 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1991.tb01701.x>
20. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 9(1), 25431. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>
21. Mendes Hacke, A. C., Miyoshi, E., Marques, J. A., & Pereira, R. P. (2020). Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113036. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>
22. Venzon, L., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T. M., Andrade, S. F. d., Nesello, L. A. N., & da Silva, L. M. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.020>
23. Moreira, F. V., Bastos, J. F. A., Blank, A. F., Alves, P. B., & Santos, M. R. V. (2010). Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 904–909. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010005000012>
24. Hagvall, L., & Bråred Christensson, J. (2014). Cross-reactivity between citral and geraniol - can it be attributed to oxidized geraniol? *Contact Dermatitis*, 71(5), 280–288. <https://doi.org/10.1111/cod.12293>
25. Sharma, S., Habib, S., Sahu, D., & Gupta, J. (2020). Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. *Medicinal Chemistry*, 17(1), 2–12. <https://doi.org/10.2174/1573406416666191227111106>
26. Lulekal, E., Tesfaye, S., Gebrechristos, S., Dires, K., Zenebe, T., Zegeye, N., Feleke, G., Kassahun, A., Shiferaw, Y., & Mekonnen, A. (2019). Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicology Reports*, 6, 1289–1294. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.002>
27. Verdier-Sévrain, S., & Bonté, F. (2007). Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6(2), 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>
28. Watkinson, A., Harding, C., Moore, A., & Coan, P. (2001). Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Archives of Dermatological Research*, 293(9), 470–476. <https://doi.org/10.1007/s004030100257>
29. Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
30. de Andrade, S. F., Rijo, P., Rocha, C., Zhu, L., & Rodrigues, L. M. (2021). Characterizing the Mechanism of Action of Essential Oils on Skin Homeostasis—Data from Sonographic Imaging, Epidermal Water Dynamics, and Skin Biomechanics. *Cosmetics*, 8(2), 36. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020036>

31. Monteiro Rodrigues, L., & Fluhr, J. W. (2019). EEMCO Guidance for the *in vivo* Assessment of Biomechanical Properties of the Human Skin and Its Annexes: Revisiting Instrumentation and Test Modes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 33(1), 44–60. <https://doi.org/10.1159/000504063>
32. Akhtar, N., Zaman, S. U., Khan, B. A., Amir, M. N., & Ebrahimzadeh, M. A. (2011). Calendula extract: effects on mechanical parameters of human skin. *Acta poloniae pharmaceutica*, 68(5), 693–701.
33. Kim, M. A., Kim, E. J., & Lee, H. K. (2018). Use of SkinFibrometer® to measure skin elasticity and its correlation with Cutometer® and DUB® Skinscanner. *Skin Research and Technology*, 24(3), 466–471. <https://doi.org/10.1111/srt.12455>
34. Ray, S., Adelnia, H., & Ta, H. T. (2021). Collagen and the effect of poly-L-lactic acid based materials on its synthesis. *Biomaterials Science*, 9(17), 5714–5731. <https://doi.org/10.1039/d1bm00516b>
35. Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
36. Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., & Zouboulis, C. C. (2011). An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermato-Endocrinology*, 3(1), 41–49. <https://doi.org/10.4161/derm.3.1.13900>
37. Maia Campos, P. M. B. G., Melo, M. O., & Mercurio, D. G. (2019). Use of Advanced Imaging Techniques for the Characterization of Oily Skin. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00254>

***In vitro* antioxidant capacity and *in vivo* hepatoprotective effect of *Allophylus edulis* leaf extract**

Capacidade antioxidante in vitro e efeito hepatoprotetor in vivo do extrato de folhas de Allophylus edulis

Antonia K. Galeano¹, Juan R. Centurión¹, María S. Soverina¹, Laura G. Mereles², Miguel A. Campuzano-Bublitz¹, María L. Kennedy^{1*}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169, San Lorenzo, Paraguay; ²Departamento de Bioquímica de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169, San Lorenzo, Paraguay

* corresponding author / autora para correspondência: lukenrol@qui.una.py

Abstract

Allophylus edulis is used in folk medicine primarily for liver conditions such as hepatitis, liver cancer and liver cirrhosis. *In vitro* hepatoprotective activity was previously demonstrated. The aim of this work was to evaluate the antioxidant capacity and hepatoprotective effect of the ethanolic extract of *A. edulis* in mice. This was done by first determining the acute toxicity of the extract, evaluating the general behavior, and subsequently verifying the effect on paracetamol-induced toxic hepatitis in male mice. Additionally, the phytochemical profile was performed, and the content of total phenols and its total antioxidant capacity were quantified through the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid radical cation (ABTS) method. The extract of *A. edulis* leaves did not demonstrate adverse effects up to 2000 mg/kg, p.o. Anthraquinones, flavonoids, triterpenoids, and tannins were detected. A high content of total phenolic compounds (TPC) was related to a high antioxidant capacity. Regarding the results of the biological tests, *A. edulis* did not affect the general behavior of the mice, and all doses tested decreased glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity, the main liver enzyme markers of hepatocellular damage. It is concluded that *A. edulis* has hepatoprotective activity, which could be related to its antioxidant activity.

Keywords: *Allophylus edulis*; hepatoprotective; acetaminophen; liver enzymes markers; antioxidant capacity

Resumo

Allophylus edulis é usado na medicina tradicional, principalmente em doenças do fígado, como hepatite, cancro e cirrose hepática. A atividade hepatoprotetora *in vitro* foi previamente demonstrada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de *A. edulis* em murgos. Para tal, foi determinada a toxicidade aguda do extrato, avaliando o comportamento geral e, posteriormente, verificando o efeito sobre a hepatite tóxica induzida por paracetamol em murgos macho. O perfil fitoquímico foi definido, e quantificado o teor de fenóis totais e a sua capacidade antioxidante total através do método do catião radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS). O extrato de folhas de *A. edulis* não demonstrou efeitos adversos até 2000 mg/kg, p.o. Foram detetados antraquinonas, flavonoides, triterpenoides e taninos. Um elevado teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi relacionado com uma elevada capacidade antioxidante. Relativamente, aos resultados dos testes biológicos, *A. edulis* não afetou o comportamento geral em murgos, e todas as doses testadas diminuíram a atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), os principais marcadores das enzimas hepáticas de dano hepatocelular. Conclui-se que *A. edulis* possui atividade hepatoprotetora, o que pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Allophylus edulis*; hepatoprotetor; paracetamol; marcadores de enzimas hepáticas; capacidade antioxidante

Introduction

The liver is essential for the metabolism of virtually all foreign substances (1). In addition, it synthesizes plasma proteins, fatty acids and is responsible for the metabolism of carbohydrates. It also stores fat-soluble vitamins, metals, such as iron and copper. This organ detoxifies drugs and other types of chemical products that are not water-soluble by means of liver enzymes that are responsible for oxidization, reduction, hydrolysis, or demethylation. Finally, Kupffer cells are responsible for the immune functions of the liver (2).

Hepatitis is an inflammation of the liver caused by a variety of infectious viruses and noninfectious agents, leading to a range of health problems, some of which can be fatal. Viral hepatitis is the most common cause of liver cirrhosis, liver cancer, and viral hepatitis-related deaths (3). The appearance of a pathological process such as hepatitis results in a public health problem, as it is generally asymptomatic, with symptoms only appearing in an advanced stage of the disease. According to a WHO report, a large percentage of affected persons do not have sufficient resources to pay for the costs of diagnosis and treatment, favoring the advance of this silent disease, which explains its high morbidity and mortality rate in those affected (4).

The infusion of the leaves of *Allophylus edulis* is popularly used in Paraguay to treat liver conditions (hepatitis, liver cancer, and cirrhosis), as a stimulant of the bile ducts, against inflammation of the throat, for intestinal problems, as an anti-diabetic, and as a cholagogue. The boiled leaves are used to wash wounds and as a treatment against high blood pressure (5,6). Regarding the biological activities, the *in vitro* hepatoprotective activity of the leaves of *A. edulis* var *gracilis* tested in primary culture of hepatocytes with damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and galactosamine has been reported, and it was confirmed that the C-glycosyl flavones present in the leaves have an important role in the hepatoprotective activity of the plant (7). In addition, the inhibitory capacity of the angiotensin-converting enzyme (8), antiulcerogenic activity (9), genotoxic activity (10), antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, and insect repellency (11,12) were reported.

This work evaluates the hepatoprotective activity of *Allophylus edulis* in mice and the antioxidant activity of the extract, in addition to the identification of the main secondary metabolites.

Introdução

O fígado é essencial para o metabolismo de praticamente todas as substâncias que nos são estranhas (1). Além disso, sintetiza proteínas plasmáticas, ácidos gordos e é responsável pelo metabolismo dos hidratos de carbono. Também armazena vitaminas lipossolúveis, metais, como ferro e cobre. Este é o órgão que nos desintoxica de fármacos e outros tipos de produtos químicos não hidrossolúveis, por meio de enzimas hepáticas que são responsáveis pela sua oxidação, redução, hidrolisação ou desmetilação. Finalmente, as células de Kupffer são responsáveis pela capacidade imunológica do fígado (2).

A hepatite é uma inflamação do fígado causada por uma variedade de vírus infecciosos e agentes não infecciosos que levam a vários problemas de saúde, alguns dos quais podem ser fatais. A hepatite viral é a causa mais comum de cirrose hepática, cancro de fígado e mortes relacionadas à hepatite viral (3). O aparecimento dum processo patológico como a hepatite resulta num problema de saúde pública, pois geralmente é assintomático, ou seja, os sintomas aparecem num estágio avançado da doença. Segundo a OMS (organização mundial de saúde), grande parte dos afetados não possui recursos suficientes para suportar os custos de diagnóstico e tratamento, favorecendo o avanço dessa doença silenciosa, o que explica sua alta taxa de morbimortalidade nos mesmos (4).

A infusão das folhas de *Allophylus edulis* é utilizada popularmente no Paraguai para tratar doenças do fígado (hepatite, cancro de fígado, cirrose), como estimulante das vias biliares, na inflamação da garganta, em problemas intestinais, como antidiabéticos e como colagogo. As folhas cozidas são usadas para lavar feridas e tratar a hipertensão arterial (5,6). Em relação às atividades biológicas, foi relatada a atividade hepatoprotetora *in vitro* das folhas de *A. edulis* var *gracilis* testadas em cultivo primário de hepatócitos danificados pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) e galactosamina, e foi confirmado que as C-glicosil flavonas presentes nas folhas têm um papel importante na atividade hepatoprotetora da planta (7). Além disso, foram relatadas capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (8), atividade antiulcerogénica (9), atividade genotóxica (10), atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e repelente de insetos (11,12).

O presente trabalho centra-se na avaliação da atividade hepatoprotetora de *Allophylus edulis* em murganhos e da atividade antioxidante do extrato, identificando os principais metabólitos secundários.

Materials and Methods

Plant material and extraction

Leaves of *Allophylus edulis* Radlk. (St Hil. Jusset Camb.) syn. *Allophylus guaraniticus* (StHil.Juss et Camb.) known as kokū (Sapindaceae) were collected from J.A. Saldívar, Central, Paraguay (25°26'50,4"S y 57° 27'07,1W). The material was identified by researchers from the Botany Department, and a voucher sample was filed in FCQ Herbarium (G Delmás 284). 200 grams of dried and powdered leaves were extracted with ethanol (1:5), first by ultrasonication (3X/day, 15 minutes each, 3 days, 30°C). The extracted material was separated, and the residual material was again extracted with ethanol by reflux (15 minutes, 3X, 1L each). The resulting extract (34%) was kept in a desiccator after solvent evaporation. On the day of each experiment, the extract was dissolved in ethanol/propylene glycol/distilled water (0.5:4:5.5) before oral administration in mice.

Reagents and equipment

Absolute ethyl alcohol 99,5% was purchased from CICARELLI Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina). TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), gallic acid monohydrate, acetaminophen, and silymarin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 2,2, azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid radical cation (ABTS) was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), gentamicin from LASCA (San Lorenzo, Paraguay), and sodium pentobarbital (Nembutal) from Abbott (Toyko, Japan). Ammonium persulfate, propylene glycol and ethanol were purchased locally. Kits for the estimation of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST or GOT), alanine aminotransferase (ALT or GPT) were purchased from HUMAN Diagnostics Worldwide (Wiesbaden, Germany). Measurements were made in a Biosystem BTS 350 semi-automatic analyzer UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Preliminary phytochemical analysis

Phytochemical analysis of ethanol extract of *A. edulis* was performed according to the methodology described (13), based on the color typically developed by major chemical groups. Briefly, anthraquinones were detected with ammonia solution after extraction with an organic solvent. The appearance of a yellow color when the sample was dissolved in a NaOH solution was evidence

Materiais e Métodos

Material vegetal e extração

Folhas de *Allophylus edulis* Radlk. (St Hil. Jusset Camb.) syn. *Allophylus guaraniticus* (StHil.Juss et Camb.) conhecido como Cocú (Sapindaceae) foram coletadas de J.A. Saldívar, Central, Paraguai (25°26'50,4"S e 57° 27'07,1W). O material foi identificado por investigadores do Departamento de Botânica, sendo arquivada uma amostra da espécie botânica no Herbário FCQ (G Delmás 284). Duzentos grammas de folhas secas e em pó foram extraídas com etanol (1:5), primeiro por ultrassom (3X/dia, 15 minutos cada, 3 dias, 30 °C). O material extraído foi separado e o material residual foi novamente extraído com etanol por refluxo (15 minutos, 3X, 1 L cada). O extrato resultante (34 %) foi mantido no exsiccador após a evaporação do solvente, e no dia de cada análise experimental foi dissolvido em etanol/propilenoglicol/água destilada (0,5:4:5,5) antes da administração oral em murganhos.

Reagentes e equipamentos

O álcool etílico absoluto 99,5% foi comprado à CICARELLI Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fé, Argentina). TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ácido gálico mono-hidratado, acetaminofeno e silimarina foram comprados à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O 2,2, azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6 catião ácido sulfônico radical (ABTS) foi comprado à AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha), gentamicina à LASCA (San Lorenzo, Paraguay), e pentobarbital de sódio (Nembutal) à Abbott (Tóquio, Japão). Persulfato de amônio, propilenglicol e etanol foram adquiridos localmente. Os kits para a estimativa de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST o GOT), alanina aminotransferase (ALT o GPT) foram adquiridos à HUMAN Diagnostics Worldwide (Wiesbaden, Alemanha). As medições foram feitas num analisador semi-automático Biosystem BTS 350 UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Análise fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica do extrato etanólico de *A. edulis* foi realizada de acordo com a metodologia descrita (13), baseada na cor tipicamente desenvolvida pelos principais grupos químicos. Resumidamente, as antraquinonas foram detetadas com solução de amônia após extração com solvente orgânico. O flavonoide foi analisado quando uma cor amarela apareceu, aquando

of flavonoids. The Liebermann-Burchard reaction was performed to identify triterpenoids. The presence of tannin was noted following reaction with ferric chloride.

Total phenol content and ABTS radical inhibition test

Determination of total phenol content in the extract was preceded by ultrasound-assisted extraction of phenols with methanol:water (60:40) and subsequently acetone:water (70:30), following reported methodology (14). Total phenolic compounds (TPC) were measured spectrophotometrically by the Folin–Ciocalteu method (16). The blue-colored complex was quantified at 765 nm. A gallic acid calibration curve was used (5-150 µg/mL), and distilled water was used as the control. The analysis was performed in triplicate and total phenol content was expressed in mg of gallic acid equivalents per 100 g of sample.

Determination of the antioxidant activity of *A. edulis* extract was carried out according to the methodology described by Re *et al* 1999 (16). This is based on the discoloration of ABTS•+ cationic radical obtained after the reaction of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate, incubated 20 hours at room temperature in the dark. On the day of measurement, the solution was diluted with absolute ethanol to reach an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 730 nm. The TAC (total antioxidant activity) quantification was performed as described previously using the linear regression method. TROLOX solutions (0-320 µM) were used as standards. The results were expressed as µM Trolox equivalents (TEAC) /g sample, and the antioxidant capacity was expressed in µMTEAC/g *per gram* of extract (17). In addition, the effective inhibitory concentration (IC50) was determined and subsequently expressed as % inhibition (%I) of sample, which was calculated according to the following: $\%I = (\text{Abs control} - \text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100$ (Abs control: solvent absorbance; Abs sample extract solution absorbance). Measurements were made in triplicate.

Animal experiments

Swiss albino male and female mice, weighing 25-35 g, were used. The animals were housed in plastic cages at a constant room temperature (23-25°C), with a 12:12 h light-dark cycle, in a humidity-controlled environment (50-60%). They were fed daily with standard animal pellets (7 g/day each) and water *ad libitum*. All assays were conducted in accordance with international standards of animal welfare, and the research protocol was approved by the Bioethical Committee of the Facultad de Ciencias Químicas (CEI

da dissolução da amostra numa solução de NaOH. A reação de Liebermann-Burchard foi feita para identificar triterpenoides. A presença de tanino foi observada após a reação com cloreto férrico.

Teor de fenólicos totais e teste de inibição do radical ABTS

A determinação do teor de fenólicos totais no extrato foi precedida por uma extração assistida por ultrassom de fenóis com metanol:água (60:40) e, posteriormente, acetona:água (70:30) seguindo a metodologia descrita (14). Os compostos fenólicos totais (TPC) foram medidos espectrofotometricamente com o método de Folin-Ciocalteu (16). O complexo de cor azul foi quantificado a 765 nm. Uma curva de calibração de ácido gálico foi usada (5-150 µg/mL) e a água destilada foi usada como controlo. A análise foi realizada em triplicado e o teor de fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra.

A determinação da atividade antioxidante do extrato de *A. edulis* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re. *et al* 1999 (16). Isto é, foi medida baseada na descoloração do radical catiónico ABTS•+ obtido após a reação de 7 mM ABTS com 2,45 mM persulfato de potássio, incubado 20 horas à temperatura ambiente no escuro. No dia da medição, foi diluído com etanol absoluto para atingir absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 730 nm. A quantificação de CAT (atividade antioxidante total) foi realizada conforme descrito anteriormente pelo método de regressão linear. As soluções TROLOX (0-320 µM) foram usadas como padrão. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox µM (TEAC)/g amostra e a capacidade antioxidante foi expressa em µM de TEAC/g por grama de extrato (17). Além disso, a concentração inibitória efetiva (IC50) foi determinada e subsequentemente expressa como % de inibição (%I) da amostra, que foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\%I = (\text{controlo de abs-amostra} - \text{abs-amostra} / \text{controlo de abs}) \times 100$ (abs controlo: absorvância do solvente; amostra de abs: absorvância da solução do extrato). As medições foram feitas em triplicado.

Experimentação animal

Foram utilizados murganhos albinos suíços, machos e fêmeas, pesando 25-35 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas em temperatura ambiente constante (23-25 °C), com ciclo luz-escuro de 12:12 h, em ambiente com humidade controlada (50-60 %). Foram alimentados diariamente com ração animal padrão (7 g/dia cada) e água *ad libitum*. Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com as normas internacionais

469/19). The minimum number of animals and duration of observation required to obtain consistent data were used, and each animal was used once (18).

Acute oral toxicity test and evaluation of general behavior (Irwin test)

The acute toxicity test was conducted following the guidelines of Test No. 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development (19). It was conducted in female mice, with oral administration of *A. edulis* ethanolic extract in fixed doses of 5, 50, 300 and 2000 mg/kg. Male mice were used for the behavioral test (Irwin test), consisting of an observational procedure to evaluate the primary effects of a drug or drug candidate on the behavior and physiological functions of the central nervous system (20, 21). The different groups received the ethanolic extract of *A. edulis* orally in doses of 50, 100, 200, and 400 mg/kg.

Acetaminophen induced hepatotoxicity and treatments

Six hours fasted Swiss albino male mice were randomly divided into seven groups (n=8). They were treated for 4 days as detailed: Vehicle group (V; 2.5% ethanol: 40% propylene glycol: 57.5% water, p.o.); Acetaminophen group (APAP; water); Silymarin group (SM; 150 mg/kg of silymarin, p.o.); groups Ae50, Ae100, Ae200, Ae 400 (treated with 50; 100, 200 and 400 mg/kg of *A. edulis* extract, respectively, p.o.). Acute hepatotoxicity was induced on the fourth day using acetaminophen (APAP, 300 mg/kg, i.p.). Two hours after the oral treatment, all animals, except those in the vehicle group, were induced (22). Three hours after APAP administration, a blood sample was collected by cardiac puncture following anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). Serum GOT, GPT and ALP were determined.

Biochemical parameters

Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and alkaline phosphatase (ALP) were measured from the blood serum. To obtain the blood serum, the fresh blood samples were incubated in a water bath at 37°C for 20 min and then subjected to centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm. The samples were processed immediately after preparation. Control serum (normal and pathological Humatrol) was processed before each measurement as an internal quality control, and the values obtained for the different biochemical parameters were consistently within the expected ranges. The activities of GPT, GOT and ALP were determined through the optimized UV

de bem-estar animal e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Ciências Químicas (CEI 469/19). Cada animal foi usado uma vez. O número de animais utilizado e a duração da observação foram os mínimos necessários para obter dados consistentes (18).

Teste de toxicidade oral aguda e avaliação do comportamento geral (teste de Irwin)

O teste de toxicidade aguda foi realizado, de acordo com as diretrizes do Teste nº 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (19). Foi realizado em murganhos fêmeas, com doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, por via oral. Foi utilizado o teste comportamental (teste de Irwin) que consiste num procedimento observacional para avaliar os efeitos primários de um fármaco ou candidato a fármaco sobre o comportamento e funções fisiológicas do Sistema Nervoso Central, de murganhos machos (20, 21). Os diferentes grupos receberam o extrato etanólico de *A. edulis* nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, por via oral.

Hepatotoxicidade induzida por paracetamol e tratamento

Murganhos machos albinos suíços em jejum de seis horas foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n=8) e tratados por 4 dias conforme segue: grupo veículo (V; 2,5% etanol: 40% propilenoglicol: 57,5% água, p.o.); grupo paracetamol (APAP; água); grupo silimarina (SM; 150 mg/kg de silimarina, p.o.); grupos Ae50, Ae100, Ae200, Ae 400 (tratados com 50; 100, 200 e 400 mg/Kg de extrato de *A. edulis*, respectivamente, p.o.). A hepatotoxicidade aguda foi induzida no quarto dia usando paracetamol (APAP, 300 mg/kg, i.p.). Duas horas após o tratamento oral, todos os animais, exceto os do grupo veículo, foram induzidos (22). Três horas após a administração de APAP, a amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Foram determinados TGO, TGP e ALP séricos.

Parâmetros bioquímicos

As transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (ALP) foram determinadas a partir do soro. Para obtenção do soro sanguíneo, as amostras de sangue fresco foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 20 minutos e depois submetidas à centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm. As amostras foram processadas

Table 1 - Total phenol content and antioxidant capacity of *A. edulis* ethanol extract.**Tabela 1** - Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do extrato etanólico de *A. edulis*.

Parameter / Parâmetro	Mean \pm SD / Média \pm DP
Total phenols compounds (mg GAE/100 g extract) / Compostos fenólicos totais (mg GAE / 100 g extrato)	36.95 \pm 0.38
Total antioxidant capacity ABTS (μ M TEAC/g) / Capacidade antioxidante total ABTS (μ M TEAC / g)	50.21 \pm 0.90
IC50 _{Extract} / IC50 _{Extrato}	17.25 \pm 0.35
IC50 _{TROLOX} / IC50 _{TROLOX}	33.72

GAE: gallic acid equivalent / GAE: equivalente de ácido gálico

method (IFCC). The absorbance was measured at 340 nm in a spectrophotometer, and the results expressed in U/L (23, 24).

Statistical analysis

The data were processed using the GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The analysis of variance (ANOVA) of one factor followed by Dunnett or the Tukey test was used for comparative analysis. Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and a p-value <0.05 considered statistically significant.

Results

Preliminary Phytochemical Analysis and Total Antioxidant Capacity of *A. edulis* extract

The TPC content, TAC, and phytochemicals on *A. edulis* ethanolic extract are presented in Table 1. The IC50 of the extract was observed to be lower than the IC50 of the control, suggesting a high antioxidant capacity of the extract. Preliminary phytochemical analysis of *A. edulis* extract indicated the presence of tannins, anthraquinones, anthraquinones glycosides, flavonoids, and triterpenoids (Table 2).

imediatamente após serem obtidas. O soro controle (Humatrol normal e patológico) foi processado antes de cada determinação, como controle de qualidade interno, e os valores obtidos para os diferentes parâmetros bioquímicos estiveram sempre dentro das faixas esperadas. As atividades de TGP, TGO e ALP foram determinadas pelo método UV otimizado (IFCC). A absorvância foi medida a 340 nm no espectrofotômetro, e os resultados expressos em U/L (23, 24).

Análise estatística

Os dados foram processados no GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A análise de variância (ANOVA) de um fator seguida do teste de Dunnett ou do teste de Tukey foi utilizada para a análise comparativa. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados

Análise Fitoquímica Preliminar e Capacidade Antioxidante Total do Extrato de *A. edulis*

O teor de TPC, TAC e fitoquímicos do extrato etanólico de *A. edulis* são apresentados na Tabela 1. Observou-se que a IC50 do extrato foi menor que a IC50 do controle, sugerindo uma alta capacidade antioxidante do extrato utilizado. A presença de taninos, antraquinonas, glicosídeos de antraquinonas, flavonoides e triterpenoides foi evidenciada após análise fitoquímica preliminar do extrato de *A. edulis* (Tabela 2).

Table 2 - Metabolites identified in *A. edulis* ethanol extract

Tabela 2 - Metabolitos identificados no extrato de *A. edulis*.

Metabolite / Metabolito	Result / Resultado
Tannin / Tanino	Positive / Positivo
Reduced sugar / Açúcar reduzido	Negative / Negativo
Non-reduced sugar / Açúcar não reduzido	Negative / Negativo
Gum / Goma	Negative / Negativo
Saponin / Saponina	Negative / Negativo
Anthraquinone / Antraquinona	Positive / Positivo
Anthraquinone glycosides/ Glicosídeos de antraquinona	Positive / Positivo
Flavonoid / Flavonoide	Positive / Positivo
Carotenoid / Carotenoide	Negative / Negativo
Triterpenoid / Triterpenoide	Positive / Positivo
Alkaloid / Alcalóide	Negative / Negativo

Acute toxicity and behavioral effect

The acute toxicity assay conducted following Test No. 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development determined that the extract does not show acute lethal toxicity, as no mortality was observed. No difference in body weights or evidence of liver, lung, pancreas, heart, or kidney damage was detected after 14 days (19). Water and food consumption were similar to the control group during the observation period. Responses to nociceptive stimuli, behavior, grooming, and postural reflex remained normal and control-like following treatment.

*Determination of the hepatoprotective effect of *A. edulis* against acetaminophen-induced damage*

In the hepatotoxicity model used, acute liver damage was induced in the animals on the fourth day of treatment, except for the animals in the control group that were treated with the extract solvent. Measurements were made on the serum of the animals obtained at the end of the experiment (after anesthesia), and the serum activity of GPT (U/L) was verified. When comparing the values obtained in the control and pathological groups (APAP), a statistically significant difference ($p < 0.0001$) between was verified, which indicated that the dose of acetaminophen used effectively induces liver damage in these experimental animals, considering the elevation of this parameter in APAP group. In addition, a statistically significant difference was also verified between the APAP group, and the SM group treated with silymarin, the reference for hepatoprotection effect, and between the APAP group and the Ae50, Ae100, Ae 200

Toxicidade aguda e efeito comportamental

O ensaio de toxicidade aguda realizado seguindo o Teste nº 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico determinou que o extrato não apresenta toxicidade aguda letal, não foi evidenciada mortalidade. Nenhuma diferença no peso corporal ou evidência de danos no fígado, pulmão, pâncreas, coração ou rim após 14 dias foi detetada (19). O consumo de água e ração comparado ao grupo controle foi semelhante durante o período de observação. As respostas aos estímulos nociceptivos, comportamento, higiene e reflexo postural mantiveram-se normais e controladas após o tratamento.

*Determinação do efeito hepatoprotetor de *A. edulis* contra os danos induzidos pelo paracetamol*

No modelo de hepatotoxicidade utilizado, a lesão hepática aguda foi induzida nos animais ao quarto dia de tratamento, exceto nos animais do grupo controle que foram tratados com o solvente do extrato.

As medições foram feitas no soro dos animais obtidos no final da experimentação após a anestesia verificando a atividade sérica da TGP (U/L). Ao comparar os valores obtidos nos grupos controle e patológico (APAP), verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) o que indicou que a dose de paracetamol utilizada efetivamente induz lesão hepática nestes animais experimentais, considerando a elevação deste parâmetro no grupo APAP. Além disso, também foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo APAP e o grupo SM tratado com silimarina,

and Ae400 groups, which were treated with different doses of the ethanolic extract of *A. edulis* (50, 100, 200 and 400 mg/kg, respectively). Serum level of GPT was lower in all extract-treated groups as well as in the SM group. Finally, no statistical difference was observed between the groups treated with the extract or with silymarin and the control group (Figure 1).

The serum GOT activity (U/L) of the different groups was also measured (Figure 2). The results showed that when comparing the values obtained in the control group and the pathological group (APAP), a statistically significant difference was evident ($p < 0.0001$), with activity highly elevated in the APAP group. This again indicated the validity of the method used to evaluate the hepatoprotective activity of the extract. Additionally, when comparing the data of serum levels of GOT of the animals of the APAP group with the data of the groups SM (treated with silymarin, $p < 0.01$), Ae50, Ae100, Ae200 and Ae400 (50, 100, 200 and 400 mg/kg of *A. edulis*, respectively, $p < 0.0001$), a statistically significant difference was found between them, silymarin reduced

referência para efeito hepatoprotetor, e entre o grupo APAP e os grupos Ae50, Ae100, Ae200 e Ae400, que foram tratados com diferentes doses do extrato etanólico de *A. edulis* (50, 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente). O nível sérico de TGP foi menor em todos os grupos tratados com o extrato, bem como no grupo SM. Por fim, não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com extrato ou com silimarina e o grupo controle (Figura 1).

A atividade TGO sérica (U/L) dos diferentes grupos também foi medida (Figura 2). Os resultados mostraram que ao comparar os valores obtidos no grupo controle e no grupo patológico (APAP), uma diferença estatisticamente significativa foi evidenciada ($p < 0,0001$) com destaque para o APAP. Isso indicou, novamente, a validade do método usado para avaliar a atividade hepatoprotetora do extrato. Adicionalmente, ao comparar os dados dos níveis séricos de TGO dos animais do grupo APAP com os dados dos grupos SM (tratados com silimarina, $p < 0,01$), Ae50, Ae100, Ae200 e Ae400 (50, 100, 200 e 400 mg/kg de *A. edulis*, respectivamente, $p < 0,0001$), foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles, com a

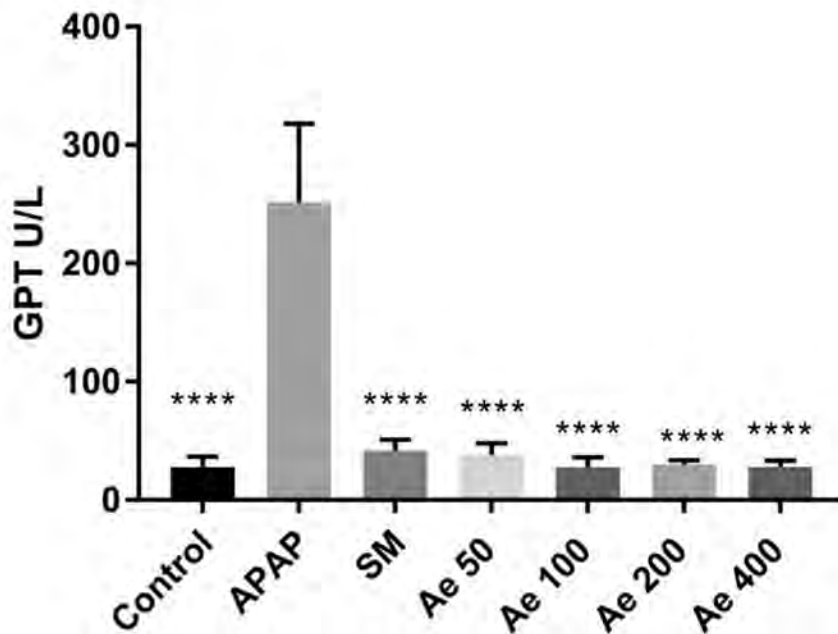


Figure 1 - Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum GPT (alanine aminotransferase or glutamic-pyruvic transaminase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. **** $p < 0,0001$, compared APAP group.

Figura 1 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de TGP (alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico-pirúvica), em murganços com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. **** $p < 0,0001$, comparado com grupo APAP.

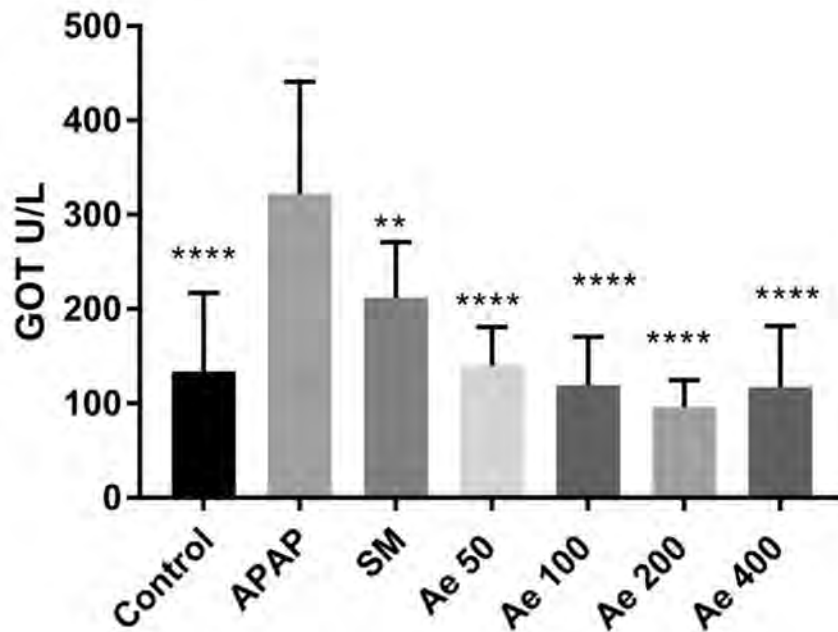


Figure 2 -Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum GOT (aspartate aminotransferase or glutamic-oxaloacetic transaminase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. ****p<0,0001, compared APAP group.

Figura 2 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de TGO (aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética), em murganhos com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. ****p<0,0001, comparado com grupo APAP.

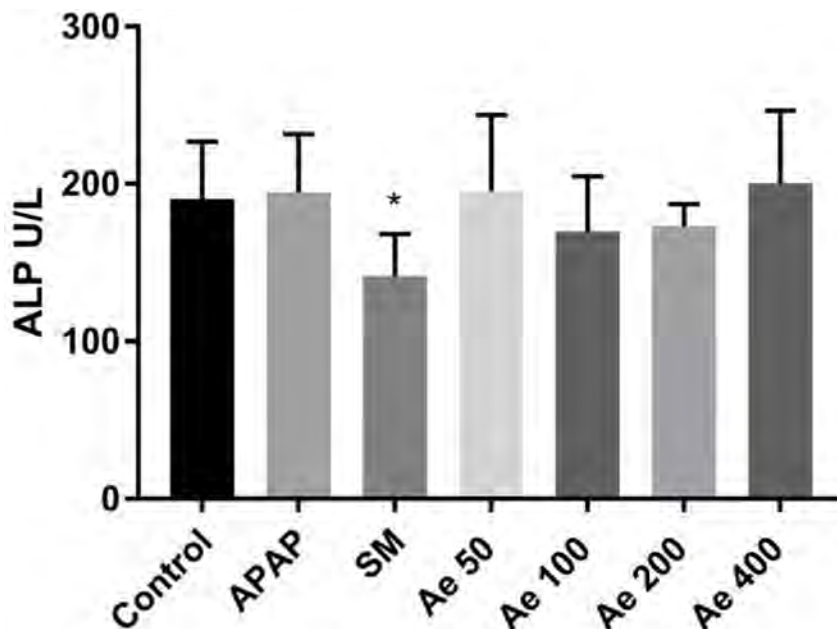


Figure 3 - Effect of oral administration of *A. edulis* ethanol extract on serum ALP (alkaline phosphatase) concentration, in mice with liver damage induced by acetaminophen. Each bar represents mean values \pm SD, n=8. ANOVA followed by Tukey test. *p< 0,05, compared APAP group.

Figura 3 - Efeito da administração oral de extrato etanólico de *A. edulis* na concentração sérica de ALP (fosfatase alcalina), em murganhos com lesão hepática induzida por paracetamol. Cada barra representa valores médios \pm DP, n=8. ANOVA seguida de teste de Tukey. *p<0,05, comparado com grupo APAP.

GOT values. Furthermore, no difference was observed between the groups that received the extract or silymarin, and the control group.

Serum alkaline phosphatase (ALP) activity in the group treated with silymarin (SM) showed a statistically significant reduction when compared to the group with toxic hepatitis induced by acetaminophen ($p < 0.05$) (Figure 3). The other treated groups did not present a significant difference with respect to the pathological group, presenting similar FA values.

Discussion

The toxicity test of the ethanolic extract of *A. edulis* in mice, up to a dose of 2000 mg/kg, showed that the extract did not cause morphoanatomical alterations in the main organs studied or the death of the animal. Therefore, according to the OECD, the extract is safe for oral use. This result is in line with a previous study using similar doses of an aqueous extract of *A. edulis* in Wistar rats, i.e., no evidence of toxicity was observed; however, an alteration in the weight of the liver was found with very high doses (5000 mg/kg), which suggests signs of toxicity in this organ (12). Following the guidelines of the OECD, doses of up to 2g/kg were used in this study (19). Likewise, the low toxicity of *A. edulis* has been reported in *in vitro* models with *Artemia salina* (25). The results obtained when evaluating the effect of the ethanolic extract of *A. edulis* on the general behavior of mice also showed the absence of general effects on autonomic or ethological parameters such as lethargy, dysuria, vomiting or regurgitation, diarrhea, spontaneous motility, defecation, piloerection, photophobia, and xerostomia.

It has been reported that *A. edulis* contains flavonoids, phenolic compounds, triterpenoids, anthraquinones, and that it does not contain saponins in aqueous and ethanolic extracts (10,25), which coincides with our results. Other authors reported the presence of alkaloids, which differs from our results (26)

The phenolic content in the extract was 36.954 ± 0.379 mg GAE/100g, while that reported in another study using *A. edulis* ethanolic extract was 17.6 ± 0.6 mg GAE/100g and for the aqueous extract was 9.0 ± 0.2 mg GAE/100g (12). This difference could be due to the dilution used by the authors (200 μ g/mL), or the time elapsed after the reaction until the absorbance measurement (2 hours), which differs slightly from the conditions used in our study.

silimarina a reduzir os valores de TGO. Além disso, não foi observada diferença entre os grupos que receberam o extrato ou a silimarina e o grupo controle.

A atividade da fosfatase alcalina sérica (ALP) no grupo tratado com silimarina (SM) apresentou decréscimo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo com hepatite tóxica induzida por paracetamol ($p < 0,05$) (Figura 3). Os demais grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo patológico, com valores de AF semelhantes entre todos.

Discussão

O teste de toxicidade do extrato etanólico de *A. edulis* em murgancho mostrou que até a dose de 2000 mg/kg não causou alterações morfoanatómicas nos principais órgãos estudados nem a morte do animal. Ou seja, de acordo com a OCDE, a sua aplicação oral é segura. Este resultado está relacionado com o que foi demonstrado utilizando doses semelhantes de extrato aquoso de *A. edulis* em ratos Wistar, ou seja, não foi observada evidência de toxicidade. Com doses muito altas (5000 mg/kg) foi encontrada uma alteração no peso do fígado, o que sugere sinais de toxicidade no órgão (12). Seguindo as diretrizes da OCDE, doses de até 2 g/kg foram utilizadas neste estudo (19). Da mesma forma, a baixa toxicidade de *A. edulis* foi relatada em modelos *in vitro* com *Artemia salina* (25). Os resultados obtidos ao avaliar o efeito do extrato etanólico de *A. edulis* sobre o comportamento geral de murganchos também mostraram a ausência de efeitos gerais sobre parâmetros autonômicos ou etológicos, como letargia, disúria, vômito ou regurgitação, diarréia, motilidade espontânea, defecação, piloereção, fotofobia e xerostomia.

Foi relatado que *A. edulis* contém flavonoides, compostos fenólicos, triterpenoides, antraquinonas, e que não contém saponinas em extratos aquosos e etanólicos (10,25), o que coincide com resultados obtidos neste estudo. Outros autores relataram a presença de alcalóides, o que difere de nossos resultados (26).

O conteúdo fenólico no extrato foi de $36,954 \pm 0,379$ mg GAE/100 g, enquanto o descrito noutro estudo utilizando extrato etanólico de *A. edulis* foi de $17,6 \pm 0,6$ mg GAE/100 g e para o extrato aquoso foi de $9,0 \pm 0,2$ mg GAE/100 g (12). Essa diferença pode ser devido à diluição utilizada pelos autores (200 μ g/mL), ou ao tempo decorrido após a reação até a medida da absorvância (2 horas), que difere ligeiramente do que é usado no nosso estudo.

The antioxidant activity expressed in IC₅₀ was higher (36.954 ± 0.379 mg GAE/100 g) than that reported in another study using *A. edulis* ethanolic extract (17.6 ± 0.6 mg GAE/100 g) and other aqueous extract (9.0 ± 0.2 mg GAE/100 g) previously reported (12), this difference could be due to the dilutions used and assay conditions. Our result is similar to data reported from experiments conducted using the ethyl acetate fraction (27). The *A. edulis* extract was higher antioxidant capacity (lower IC₅₀) than the reference substance TROLOX (Table 1). It has been reported that the antioxidant capacity of *A. edulis* is related to the extract TPC content (12). On the other hand, a moderate antioxidant activity of the essential oil of *A. edulis* and its main component viridiflorol has been reported (28). Moreover, aqueous extracts of another member of this genus, *A. rubifolius*, have exhibited a high antioxidant activity (IC₅₀ 7.1 ± 0.1 µg/mL) in the DDPH assay (29).

Regarding the study of the effect of the extract on the model of hepatotoxicity induced by APAP in mice, it was determined that the pathological group exhibited an increase in GPT and GOT activity compared to the control group (p < 0.0001) since the metabolism of APAP and hepatic necrosis are the main events during the first hours after the administration of APAP (22). A significant reduction (p < 0.0001) of liver enzymes GPT, GOT was also found in animals treated with all doses of *A. edulis* extract compared to the control group. This result is similar to that observed in the group treated with silymarin (GPT p < 0.0001 and GOT p < 0.01). In the case of silymarin, this result was what was expected, considering that it is the reference hepatic protective drug (30).

Regarding the activity of ALP, it was found that only the group treated with silymarin presented a statistically significant reduction with respect to the pathological group (p < 0.05), in the other groups no difference was observed with the APAP group. This could be because this enzyme is not a specific marker of the liver and therefore the presence of an alteration in the level of ALP is not always indicative of hepatocellular damage (31), but when there is hepatic obstruction of the bile flow, it can be elevated (32). In addition, the time elapsed for sample collection after APAP administration in the hepatotoxicity model used is not sufficient to cause damage at that level.

In general terms, similar values were observed in the GPT and GOT parameters in the animals treated with the different doses of *A. edulis* extract and those treated with silymarin. This could be due to the antioxidant property of *A. edulis* that is associated with the

A atividade antioxidante expressa em IC₅₀ foi maior (36,954 ± 0,379 mg GAE/100g) do que a descrita noutro estudo utilizando extrato etanólico de *A. edulis* (17,6 ± 0,6 mg GAE/100g) e outro extrato aquoso (9,0 ± 0,2 mg GAE/100g) relatados anteriormente (12), essa diferença pode ser devido às diluições utilizadas e às condições do ensaio. Os resultados deste estudo são semelhantes aos dados descritos para a fração de acetato de etilo (27). O extrato de *A. edulis* apresentou maior capacidade antioxidante (menor IC₅₀) do que a substância de referência TROLOX (Tabela 1). Tem sido relatado que a capacidade antioxidante de *A. edulis* está relacionada com o teor de TPC do extrato (12). Por outro lado foi relatada uma atividade antioxidante moderada do óleo essencial de *A. edulis* e do seu principal componente viridiflorol (28). Além disso, o extrato aquoso doutro membro deste género, *A. rubifolius*, exibiu uma alta atividade antioxidante (IC₅₀ 7,1 ± 0,1 µg/mL) no ensaio DDPH (29).

Relativamente ao estudo do efeito do extrato no modelo de hepatotoxicidade induzida por APAP em murganhos, foi determinado que o grupo patológico apresentou um aumento na atividade de TGP e TGO em relação ao grupo controlo (p < 0,0001), uma vez que o metabolismo do APAP e necrose hepática são os principais eventos durante as primeiras horas após a administração de APAP (22). Uma redução significativa (p < 0,0001) das enzimas hepáticas TGP e TGO, também, foi encontrada em animais tratados com todas as doses de extrato de *A. edulis* em relação ao grupo controlo. Esse resultado é semelhante ao observado no grupo tratado com silimarina (TGP p < 0,0001 e TGO p < 0,01). No caso da silimarina, esse resultado era espectável, considerando que é o fármaco hepatoprotetor de referência (30).

No que diz respeito à atividade da ALP, verificou-se que apenas o grupo tratado com silimarina apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo patológico (p < 0,05), nos demais grupos não foi observada diferença com o grupo APAP. Isso pode ser porque essa enzima não é um marcador específico do fígado e, portanto, a presença de uma alteração no nível de ALP nem sempre é indicativa de dano hepatocelular (31), mas quando há obstrução hepática do fluxo biliar pode ser elevado (32). Além disso, o tempo decorrido para a colheita da amostra após a administração de APAP no modelo de hepatotoxicidade utilizado não é suficiente para causar danos nesse nível.

Em termos gerais, os valores semelhantes foram observados nos parâmetros TGP e TGO nos animais tratados com as diferentes doses de extrato de *A. edulis* e nos tratados com silimarina, o que pode ser

presence of phenolic compounds, and it agrees with what was previously found in an *in vitro* study (7). The liver damage caused in the hepatotoxicity model used involves oxidative stress (30).

At this point it is worth mentioning that the role of phenolic compounds of natural origin in hepatoprotection has been reported (33). These compounds can stabilize the free radicals generated by inhibiting the formation and expression of inflammatory cytokines, interleukins, transforming growth factor β (TGF- β), and tumor necrosis factor α (34). Finally, the regulation of the expression of several genes has also been reported according to the hepatotoxicity model studied (33).

Conclusion

In this work we demonstrated that the ethanolic extract of *A. edulis* is safe to be used orally in the doses tested, it does not affect the general behavior or the general activity of mice. It has been observed that the *A. edulis* extract has antioxidant capacity, related to presence of total phenolic compounds such as tannins and flavonoids. Finally, according to the evidence obtained in the liver damage test induced by paracetamol in mice, the extract has hepatoprotective activity, which could be associated with its antioxidant activity.

devido às propriedades antioxidantes de *A. edulis* que está associada à presença de compostos fenólicos, e concorda com o que foi encontrado anteriormente num estudo *in vitro* (7). A lesão hepática causada no modelo de hepatotoxicidade utilizado envolve *stress* oxidativo (30).

A este propósito devemos referir que o papel dos compostos fenólicos de origem natural na hepatoproteção já se encontram descritos (33). Esses compostos podem estabilizar os radicais livres gerados pela inibição da formação e expressão de citocinas inflamatórias, interleucinas, fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de necrose tumoral α (34). Finalmente, a regulação da expressão de vários genes também foi descrita de acordo com o modelo de hepatotoxicidade estudado (33).

Conclusão

Neste estudo demonstramos que o extrato etanólico de *A. edulis* é seguro para administração oral nas doses testadas, não afetando o comportamento ou atividade geral dos murganhos. Observou-se que o extrato de *A. edulis* possui capacidade antioxidante, relacionada com a presença de compostos fenólicos totais, como taninos e flavonoides. Por fim, de acordo com os resultados obtidas no teste de lesão hepática induzido por paracetamol em murganhos, o extrato possui atividade hepatoprotetora, que pode estar associada à sua atividade antioxidante.

Authors' Contributions statement

All authors have made substantial contributions to this work, read the final manuscript, and approved the submission. AKG, JRC, MSS, MACB, LK collaborated in the concept and design of biological experiments, data acquisition, data analysis and interpretation, statistical analysis. LGM and AKG conducted the antioxidant experiments. MACB and LK drafted the manuscript. All authors were involved in critical revision and final approval.

Acknowledgements

The authors acknowledge Professor G. Delmás of the Department of Botany, Facultad de Ciencias Químicas, for plant collection and identification, and Mr. N. Kennedy for the English language revision.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This research was supported by Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. AKG conducted the work during her master's program (MCQB) supported by CONACYT, Paraguay (PROCIENCIA POSG16-160).

Declaração de contribuições dos autores

Todos os autores fizeram contribuições substanciais para este trabalho, leram o manuscrito final e aprovaram a submissão. AKG, JRC, MSS, MACB, LK colaboraram na conceção e desenho de experimentos biológicos, aquisição de dados, análise e interpretação de dados, análise estatística. LGM e AKG realizaram os ensaios de antioxidantes. A escrita do manuscrito foi feita por MACB e LK. Todos os autores participaram da revisão crítica e aprovação final.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor G. Delmás, do Departamento de Botânica da Facultad de Ciencias Químicas pela recolha e identificação das plantas; ao Sr N. Kennedy pela ajuda na transversão do texto para língua inglesa.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflitos de interesse.

Financiamento

Esta investigação foi apoiada pela Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Assunção, Paraguai. AAKG realizou o trabalho durante o mestrado (MCQB) apoiado pela CONACYT, Paraguai (PROCIENCIA POSG16-160).

References / Referências

- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2022). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. PMID: 30571059.
- Liu, X., Wang, H., Liang, X., & Roberts, M.S. (2017). Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In: P. Muriel (ed.) *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* (Chapter 30, p 391-400). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00030-8>
- https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1
- Hernandez N, Pontet Y, Bessone F. (2020) Translating new knowledge on drug-induced liver injury into clinical practice. *Frontline gastroenterology*, 11(4), 303–310. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2018-101120>
- Díaz, M., González, A., Castro-Gamboa, I., Gonzalez, D., & Rossini, C. (2008). First record of l-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Carbohydrate Research*, 343(15), 2699-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.07.014>
- Kujawska, M., Schmeda-Hirschmann G. (2021). The use of medicinal plants by Paraguayan migrants in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina, is based on Guaraní tradition, colonial and current plant knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 283, 114702. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114702.
- Hoffmann-Bohm, K., Lotter, H., Seligmann, O., & Wagner, H. (1992). Antihepatotoxic C-Glycosyl flavones from the Leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. *Planta Medica*, 58(06), 544-548. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961546>
- Mitchell, J. (1988). Acetaminophen Toxicity. *New England Journal of Medicine*, 319(24), 1601-1602. <https://doi.org/10.1056/nejm198812153192409>
- Dharmani, P., Mishra, P., Maurya, R., Singh Chauhan, V., & Palit, G. (2005). *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.011>
- Yajía, M., et al. (1999). Genotoxicity evaluation of *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. *Acta Horticulturae*, 501, 31-36. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1999.501.2>
- Castillo, L., González-Coloma, A., González, A., Díaz, M., Santos, E., Alonso-Paz, E., Bassagoda, M. J., & Rossini, C. (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.05.004>
- Signor, C., Benites, L., Pereira, U., dos Santos, P., Barros, S., de Melo, A., et al. (2015). Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess.) Hieron. ex Niederl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(11), 353-362. <https://doi.org/10.5897/ajpp2015.4270>
- Houghton, D.J.P. & Raman, A. (1998) Manual de laboratorio para el fraccionamiento de extractos naturales. Chapman y Hall, Londres, 199. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5809-5>
- Caballero, S.; Mereles, L.; Burgos-Edwards, A.; Alvarenga, N.; Coronel, E.; Villalba, R.; Heinichen, O. (2021). Nutritional and bioactive characterization of *Sicana odorifera* Naudim Vell. seeds by-products and its potential hepatoprotective properties in Swiss albino mice. *Biology* 10(12), 1351. <https://doi.org/10.3390/biology10121351>
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-calceal reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an 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)
- Mereles, L., Caballero, S., Burgos-Edwards, A., Benítez, M., Ferreira D., Coronel, E., et al. (2021). Extraction of total anthocyanins from *Sicana odorifera* black peel fruits growing in Paraguay for food applications. *Applied Sciences*, 11, 6026. doi.org/10.3390/app11136026
- National Research Council. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. (8th ed.). National Academies Press.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2002). Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, 1-14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. (2004). Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current Protocols in Pharmacology*, 27(1), 10.10.1-10.10.23. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>
- Zavala-Flores, E., Goicochea-Lugo S., Arguro-Muñoz T., Adrianzen-Rodriguez S., Coronel-Bustamante G., Salazar-Granara A. (2013). Intestinal motility and nervous system effects dose-response curve for the interaction between *Jatropha curcas* L. and metoclopramide. *Acta Med Per*, 30(3), 120-127.
- Mossanen, J., & Tacke, F. (2015). Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Laboratory Animals*, 49(1_suppl), 30-36. <https://doi.org/10.1177/0023677215570992>
- Dufour, D., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S., Seeff L.B. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry*, 46(12), 2027-2049. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2027>
- Strömme, J., & Eldjam, L. (1974). Scandinavian Standardizations of Enzyme Determination. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 33(4), 287–289.
- Arruda, G., Périco L.G.V., Scur M.C., Parpinelli R., Peretti R.F., Follador F.A.C. (2019). Phytochemical prospecting, antimicrobial activity, and acute toxicity of aqueous plant extract of two plant species *Allophylus edulis* (A. St. Hilaire, Cambessedes & A. Jussieu) RADLK ex WARM and *Matayba elaeagnoides* RADLK. *International Journal of New Technology and Research*, 5(2), 10-13. <https://doi.org/10.31871/ijntr.5.2.7>
- Bharat, R., & Gaikwad, D. (2016). The ethnobotany, phytochemistry and biological properties of *Allophylus* species used in traditional medicine: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (11), 664-682.
- Sobottka, A.M., Tessaro E., Maier da Silva S., Pedron M., Tortini Seffrin L. (2021). Polyphenol content and antioxidant potential of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil. et al.) Hieron. ex Niederl. and *Cupania vernalis* Cambess. (SAPINDACEAE) *Revista Árvore* 45(1), e4507. <https://doi.org/10.1590/1806-908820210000007>
- Trevizan, L. N. F., Nascimento, K. F. do, Santos, J. A., Kassuya, C. A. L., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. do C., Moreira F.M.F., Croda J., Formagio, A. S. N. (2016). Anti-inflammatory, antioxidant and anti- Mycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 510–515. doi:10.1016/j.jep.2016.08.053
- Marwah, R., Fatope, M., Mahrooqi, R., Varma, G., Abadi, H., & Al-Burtamani, S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, 101(2), 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.001>
- Papackova Z., Heczkova M., Dankova H., Sticova E., Lodererova A., Bartonova L., Poruba M., Cahova M. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*. 17, 13(1):e0191353. doi: 10.1371/journal.pone.0191353.
- Newsome, P. N., Cramb, R., Davison, S. M., Dillon, J. F., Foulerton, M., Godfrey, E. M., Hall, R., Harrower, U., Hudson, M., Langford, A., Mackie, A., Mitchell-Thain, R., Sennett, K., Sheron, N. C., Verne, J., Walmsley, M., & Yeoman, A. (2018). Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut*, 67(1), 6–19. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314924>
- Schumann, G., Bonora G., Ceriotti F., Férrard G., et al. (2002). IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 5. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(7), 725-733. <https://doi.org/10.1515/cclm.2002.125>
- Saha, P., Talukdar, A., Nath, R., Sarker, S., Nahar, L., Sahu, J., & Choudhury, M. (2019). Role of natural phenolics in hepatoprotection: a mechanistic review and analysis of regulatory network of associated genes. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1-59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00509>
- Rani, V., Deep, G., Singh, R., Palle, K., & Yadav, U. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Contents / Conteúdos

- 1 **Editorial: This issue in brief**
Este numero em breves notas
L. Monteiro Rodrigues
- 3 **Exploratory Study on Municipalization of Health in Angola – Characterization of Human Resources for Health staffing and Health Units’ managers’ profile in Healthcare services and Training institutions of Cabinda Province**
Estudo Exploratório sobre a Municipalização da Saúde em Angola - Caracterização dos recursos humanos da saúde e do perfil dos gestores das Unidades de Saúde e das instituições de formação na Província de Cabinda
Teresa Macosso, Alberto Macosso, Maria do Céu Costa, João Gregório
- 19 **Factors influencing breastfeeding duration among Portuguese mothers**
Fatores que influenciam a duração do aleitamento materno entre mães portuguesas
Mariana Z. de Oliveira, Cíntia Ferreira-Pêgo
- 31 **Anthropometric evaluation of pre-school and school-age children from the European Macaronesian regions**
Avaliação antropométrica de crianças em idade pré-escolar e escolar da Macaronésia Europeia
Nelson Tavares, Tatiana Silva, Cíntia Ferreira-Pêgo
- 42 **Food insecurity in the households of the Algarve**
Insegurança Alimentar em Agregados Familiares no Algarve
Ezequiel Pinto, Filipa Guerreiro, Artur Gregório, Maria Palma Mateus
- 58 **Short duration – low intensity isometric plantar flexion increases distal perfusion: observations from a healthy cohort**
A flexão plantar isométrica de baixa intensidade e curta duração aumenta a perfusão distal: observações de uma coorte saudável
Margarida Florindo, João Gregório & Luis Monteiro Rodrigues
- 72 **Do community pharmacy workers know how to use adrenaline autoinjectors?**
Os profissionais das farmácias comunitárias sabem utilizar autoinjectores de adrenalina?
Ana Margarida Mesquita, Ricardo Moço Coutinho, José Luís Plácido, Alice Coimbra
- 82 **Ionic exchange membranes in pharmaceutical industry – Review**
Membranas de troca iónica aplicáveis na indústria farmacêutica – Revisão
Ana Morais, Belen Batanero, Patrícia Rijo and Marisa Nicolai
- 114 **Reporting suspected adverse reactions to COVID-19 vaccines in Portugal: side effects per vaccine type, gender, and age up to July 2021**
Notificação de suspeitas de reações adversas às vacinas COVID-19 em Portugal: efeitos indesejáveis por tipo de vacina, género e idade até julho de 2021
Carla Pires
- 133 **Serious Adverse Reactions to COVID-19 vaccines in Portugal up to July 2021: thrombosis with thrombocytopenia syndrome, myocarditis/pericarditis, and Guillain-Barré syndrome**
Reações adversas graves das vacinas COVID-19 em Portugal até julho de 2021: síndrome de trombose com trombocitopenia, miocardite/pericardite e síndrome de Guillain-Barré
Carla Pires
- 153 **Ionic liquids as tools to improve gel formulations containing sparingly soluble phenolic acids**
Líquidos iónicos como ferramentas para melhorar formulações gel contendo ácidos fenólicos pouco solúveis
Ana Júlio, Nádia Remtula, Marisa Nicolai, Tânia Santos de Almeida
- 168 **Cymbopogon citratus (DC.) Stapf essential oil: Unraveling potential benefits on human skin**
Cymbopogon citratus (DC.) Stapf óleo essencial: Desvendando potenciais benefícios na pele humana
Sérgio Faloni de Andrade, Eucínario José Pinheiro, Catarina Pereira-Leite, Maria do Céu Costa, Ana Cristina Figueiredo, Luis Monteiro Rodrigues
- 181 **In vitro antioxidant capacity and in vivo hepatoprotective effect of Allophylus edulis leaf extract**
Capacidade antioxidante in vitro e efeito hepatoprotetor in vivo do extrato de folhas de Allophylus edulis
Antonia K. Galeano, Juan R. Centurión, María S. Soverina, Laura G. Mereles, Miguel A. Campuzano-Bublitz, María L. Kennedy

Supplements | Suplementos

S195 **Abstract Book - II Bio.Natural - Bioactive Natural Products Research Meeting (virtual), November 2021**
Livro de Resumos - II Bio.Natural - Bioactive Natural Products Research Meeting (virtual), novembro 2021

S230 **Abstract Book - 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, 2021 - Ribeirão Preto, Brazil**
Livro de Resumos - 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, 2021 - Ribeirão Preto, Brasil