

Biomed Biopharm Res
16 (2) 148 - 234 (2019)

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



Vol. 16, No. 2

Biomedical and Biopharmaceutical Research

Jornal de Investigação
Biomédica e Biofarmacêutica



Associação Lusitana
para o Desenvolvimento
da Física e Investigação
em Ciências de Saúde

Editor

Luís Monteiro Rodrigues, ULHT, Lisboa, Portugal

Honorary Editors | *Editores Honorários*

Leonor dos Reis, FMUL, Lisboa, Portugal

Associate Editors | *Editores Associados*

André Babo, USP, São Paulo, Brasil
Patrícia Maia Campos, USP, Ribeirão Preto, Brasil
Michele Fleich Otaki, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil
Roberto Postanolo, Univ Federal do Paraná, Brasil
Vânia Leite e Silva, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brasil
Fernando Ferreira Vicente, Hospital Municipal da Caila, Huambo, Angola
Juares Souza, IESPES, Santarém, Brasil
Eliasa Ostrosky, UFRN, Rio Grande do Norte, Brasil
Matheus Pedrosa, UFRN, Rio Grande do Norte, Brasil

Editorial Board | *Conselho Editorial*

José Delgado Alves, FCM/UNI, Lisboa, Portugal
Daniela Cabrini, Dep Farmacol., Univ Federal do Paraná, Brasil
Louis Carrière, University of Montreal, Canada
Giovani Favero, Dep Biologia Geral, Univ Estadual de Ponta Grossa, Brasil
Daniel Fernandes, DCF - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil
Newton Andréo Filho, UNIFESP/ Diadema, SP, Brasil
Aline Laçada, USP, São Paulo, Brasil
Cláudio Leme, Pontifícia U. Católica, SP, Brasil
Márcia Mello do, USP - São Paulo, Brasil
Ana Paula Ribeiro, UNIP - Goiás - Brasil
Eduardo Santana, USP, São Paulo, Brasil
Oscar Amaro de Sequeira, U.Algarve, Portugal
Patrícia Santos e Silva, UNIBAM, Universidade Bandeirante de São Paulo, Brasil
Pedro Dinis Almeida, FCUL, Lisboa, Portugal
Catarina Pinto Reis, FFUL, Lisboa, Portugal
Isabel Vitória Figueiredo, FFUC, Coimbra, Portugal

José Patrício, FMUC, Coimbra, Portugal
Margarida Castelo-Branco, FFUC, Coimbra, Portugal
Margarida Camarosa, FFUC, Coimbra, Portugal
Ricardo A. Inês, FCM - UNI, Lisboa, Portugal
Cid Ambrósio, Sociedade Brasileira de Farmacognosia Curitiba, Brasil
Aenóbio Júnior, UFRN, Rio Grande do Norte, Brasil

The Biopharmaceutical and Biomedical Research Journal is indexed (or applied) in the following international networks:

- Directory System LATINDEX regional information system online for Scientific Journals of Latin America, Caribbean, Spain, and Portugal. <http://www.latinindex.unam.mx/>
- UNIVERSIA, Universities Portal. <http://www1.universia.es/CatálogoXXI/C10046PPPTII2/S12209/P11840NN5/INDEX.HTM>
- KOSMET, Database Platform devoted exclusively to Cosmetic Industry
- INDEX RE VISTAS MÉDICAS PORTUGUEAS, Portuguese Database of literature and medical theses. <http://http://www.indexrmp.com/>
- Google Scholar RCAAP (Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal). projeto.rcaap.pt
- Recil (Repositório Científico Lusófono). recil.gnuplusofono.pt
- Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). <http://www.capes.gov.br/>
- MEDRA (multilingual European Registration Agency of DOI). <http://www.medra.org/>
- Crossref (Metadata and bibliographic connections). <http://www.crossref.org/>
- REDIB (Rede Iberoamericana de Investigación e Conocimiento Científico). <https://www.redib.org/>

Property (Propriedade)

ALIES - Associação Lusitana para o Desenvolvimento da Física e Ensino em Ciências da Saúde

Registered Office and Correspondence (Sede Social e Correspondência)

ALIES
Campo Grande, 376
1749-024 Lisboa

Tel: +351217515550 Fax: +351217515598

Electronic correspondence

Correspondência Eletrónica
director@alies.pt
bbr_office@alies.pt

Distribution (Distribuição)

ALIES

Cover and Pagination (Capa e Paginação)

ALIES

Edition (Edição)

100 exemplares

Print (Impressão)

EUROPRESS, Lda

Dep. Legal: 33195511

ISSN Print: 2182-2360

ISSN Online: 2182-2379

Electronic Edition (Edição Eletrónica)

www.alies.pt

Subscription Terms

Biomedical and Biopharmaceutical Research

Jornal de Investigação
Biomédica e Biofarmacêutica

Send this information to:

bbr_office@alies.pt
Campo Grande 376 - 1749-024 Lisboa

Name _____ Age _____ Address _____
Zip Code _____ Tel _____

Fax _____ Mobile _____ Email _____

Workplace _____

Specialty _____

Performed function _____

I want to formalize my signature of BBR for a period of: (indicate with X) 1 Year (35 Euros) 2 Years (70 Euros)

I send to, endorsed to ALIES

Cheque n° _____ on the Bank _____

Data Accounting for the Effects of Issuance of Receipts:

Designation _____

Address _____

Tax No. _____ Date and Signature _____

Journal Subscription Form

This Journal is dedicated to publish and promote knowledge and reflection on questions related to Health, giving priority to those related to the Portuguese reality, as well as those in other lusophone (Portuguese speaking) areas. The intention therefore is to catalyze a proficuous dialogue and exchange of experiences between health professionals and researchers from the lusophone communities and its projection on, and interchange with the international scientific community.

In order to attain such objectives, it has become indispensable to establish, from the beginning, a set of norms that guarantee a publication which respects the internationally established criteria for publications in the biomedical field. The main norms, which have been adapted to the above mentioned objectives, have the document "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to the Biomedical Journals" (available at URL: www.icmje.org) as their main orientation and are as follows:

I. The "Biomedical and Biopharmaceutical Research" (BBR) publishes original research and revision articles as well as other works of a pedagogical and scientific nature, in the different domains of the Health Sciences and Technologies, in portuguese and english languages.

II. It also publishes news, information, minutes and/or reports, as well as abstracts and proceedings of works presented in meetings, courses or congresses.

III. The authors have the final responsibility for the content of their publications.

IV. Only works that contain original material will be evaluated, as long as they have not been integrally or partly published (including tables and figures), and have also not been submitted for publication to other journals or periodicals. This restriction does not apply to press notes or summaries published in the realm of scientific meetings.

V. All the published articles become property of the BBR. Once accepted, the works cannot be published in a similar form in other places, and in no other language, without the express consent of BBR.

VI. Before submitting a manuscript to BBR, the authors must get all the necessary authorizations for the submitted material to be published and when applicable, according the publication norms from the journal. In the terms already mentioned, several types of papers are considered for publication in BBR:

1. Original articles of original research (full-papers)

The text must not exceed 10 A4 pages (excluding references and tables) and be organized according the following structure: introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements and bibliographical references.

All the articles of original research must have abstracts, followed by keywords that aim at a clear identification of the work, respective indexation and research.

2. Brief articles and communications (shorts papers)

This type of publication is focused on the divulgation of preliminary results of research carried out. The text must be organized as the articles of original research, include a maximum of 10 references and do not exceed five A4 pages.

3. Review Articles

These are articles whose objective is to describe "the state of the art", reflecting the progress in the diverse the domains of health sciences and technologies. This type of publication must be directed especially towards health professionals and students. Along with the pedagogical nature, the aim is to alert the readers for the impact of this progress on health care service. BBR editorial staff will give preference to and promote the publication of revision articles that have been expressly requested, however, those submitted, but not requested, will be also evaluated.

4. Case Studies

The publication of case studies (of clinical or other nature), has both pedagogical objectives and the transmission of experiences. They must, consequently, be studied and discussed in an exemplary form, and the text must be organized with those objectives in mind.

5. Other texts and documents

BBR accepts texts based on multiple humanistic aspects that are involved in health care service as well as those related to history, ethics, anthropology, sociology, law, etc. that are of relevance to health sciences and technologies.

Manuscripts Format

(a) The instructions to be followed by authors for submission of papers to BBR, are listed below and are according to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available at URL: www.icmje.org).

(b) The papers must be submitted in English and Portuguese. The manuscripts must be typed, double spaced and aligned at the left, with margins of 2.5 cm, font size 11, and font Times, Times New Roman, or Arial, and use Symbol for special characters. All the pages are numbered. Each section begins on a new page.

(c) The manuscripts general organization must respect the following sequence:

- On the first page indicate: 1) title (concise and descriptive) in Portuguese; 2) complete title in English; 3) name(s) of author(s) (without indication of academic degrees or honorific titles); 4) the institutional affiliation of each author at the moment when the work was carried out; 5) the name and contact of the author who should receive correspondence, including address, telephone, fax and email; 6) reference to financing sources or scholarships (when applicable).

- Abstracts (2nd page) - maximum of 200 words. The abstract must be concise and indicate the objectives/scope, results and conclusions, or a summary description of the case studies presented. Each abstract will contain, on the same page, the respective keywords (up to 5).

Este Jornal propõe-se divulgar e promover o conhecimento e a reflexão sobre as questões relacionadas com a Saúde, com prioridade para com as relacionadas com a realidade nacional, bem como as existentes noutros espaços lusófonos. Pretende-se, por este meio, catalisar um proficuo diálogo e troca de experiências entre os profissionais e investigadores de saúde nas comunidades lusófonas e a sua projecção e intercâmbio com a comunidade científica internacional.

Para tais objectivos serem atingidos, torna-se indispensável estabelecer desde o início um conjunto de normas garantes duma publicação que respeite os critérios estabelecidos internacionalmente para as publicações de índole biomédica. As principais normas, adaptadas aos objectivos acima enunciados,

são seguidamente expostas, tendo por orientação o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: www.icmje.org).

I. O Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacéutica (BBR) publica trabalhos originais de investigação, de revisão e outros trabalhos de índole pedagógica e científica, nos diferentes domínios das Ciências e Tecnologias da Saúde, em português e inglês

II. Publica também notícias, informações, actas e/ou relatórios, bem como o resumo dos trabalhos apresentados em reuniões, cursos ou congressos.

III. A responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

IV. Apenas serão avaliados os trabalhos contendo material original que não hajam sido publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam submetidos para publicação noutros jornais ou revistas. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas.

V. Todos os artigos publicados passam a ser propriedade da BBR. Uma vez aceites, os trabalhos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento expresso da BBR.

VI. Antes de submeter um manuscrito à BBR, os autores devem obter todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido e, na medida do aplicável, respeitar as normas orientadoras de publicação da revista.

Nos termos já enunciados, são considerados vários tipos de trabalhos susceptíveis de publicação na BBR:

1. Artigos originais de investigação original (full-papers)

O texto não excedendo 10 páginas A4 (excluindo referências tabelas e figuras) deve ser organizado de acordo com seguinte estrutura: introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos e referências bibliográficas.

Todos os artigos de investigação original devem ser antecedidos por resumos, seguidos das palavras-chave que visem uma clara identificação do trabalho, respectiva indexação e busca.

2. Artigos e comunicações breves (short papers)

Este tipo de publicação destina-se à divulgação de resultados preliminares de trabalhos de investigação. O texto deve ser organizado tal como os artigos de investigação original, não devendo exceder as cinco páginas A4, e incluir um máximo de 10 referências.

3. Artigos de revisão

São artigos cujo objectivo é descrever o "estado-da-arte", ou seja os progressos nos diversos domínios das ciências e tecnologias da saúde. Este tipo de publicação deve ser especialmente dirigida aos profissionais de saúde e estudantes. A par da índole pedagógica, visam alertar uns e outros para o impacto destes progressos na prestação dos cuidados de saúde. O corpo editorial da BBR, promoverá a publicação preferencial de artigos de revisão por ele expressamente solicitados, sem prejuízo de avaliar artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia.

4. Estudo de casos

A publicação de casos (clínicos ou de outra natureza), tem objectivos pedagógicos e de transmissão de experiências. Devem, por consequência, ser estudados e discutidos de forma exemplar, devendo o texto ser organizado com aqueles objectivos em atenção.

5. Outros textos e documentos

A BBR propõe-se aceitar textos livres que incidam sobre as múltiplas vertentes humanísticas envolvidas na prestação de cuidados de saúde, como sejam os relacionados com a história, ética, antropologia, sociologia, direito, etc. com relevância para as ciências e tecnologias da saúde.

Formatação dos Manuscritos

(a) As instruções a observar pelos autores para submissão de trabalhos à BBR, abaixo enunciadas, seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: www.icmje.org).

(b) Os trabalhos devem ser submetidos em português e inglês. O manuscrito deve ser dactilografado a dois espaços e justificado à esquerda, com margens de 2,5 cm, com letra a 11 pontos, tipo Times, Times New Roman, ou Arial, utilizando a fonte Symbol para caracteres especiais. Todas as páginas são numeradas. Cada secção inicia-se em nova página.

(c) A organização geral do manuscrito deve respeitar a seguinte sequência:

- Na primeira página indicar: 1) o título (conciso e descritivo) em português; 2) o título completo em inglês; 3) nome (s) do(s) autor(es) (sem indicação de graus académicos ou títulos honoríficos); 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado; 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e @mail; 6) referência às fontes de financiamento ou bolsas de estudo (quando aplicável).

- Resumos (2ª página) com um máximo de 200 palavras. Os resumos deverão ser concisos e indicar os objectivos/âmbito, resultados e conclusões, ou a descrição sumária dos casos (estudo de casos) apresentados. Cada resumo será complementado, na mesma página, com as respectivas palavras-chave até 5.

- Text - the text must be structured in the traditional form, that is, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions and Acknowledgements. Small adaptations to the structure are admitted (inclusion of subparagraphs in Material and Methods, for example) in accordance with the nature of the work presented.

- References/Bibliography - the references must be listed after the main text, consecutively numbered in accordance with the order of its citation. The references must be presented in Arabic numeration, between parentheses and the respective citation must follow the adequate model of the respective source (article from a periodical, book, book chapter, Internet, etc.).

Models:

Article

Vega KJ, Pina I, Krevsky. Heart transplantation is associated with increase risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:980-3.

Book

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Book Chapter

Phipps SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.465-478.

Article in Electronic Format

Morse SS. Factor in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. in: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

The abbreviated names of the publications must be in accordance with the Index Medicus. A list of publications can be obtained at <http://www.nlm.nih.gov>.

We suggest that the bibliography of submitted articles is made with the aid of a citation program, such as the EndNote (from the Institute of Scientific Information). Among the various styles available, the above mentioned corresponds to that used in the Nature magazine.

- Legends, Tables and Figures

Legends of Tables and Figures must be put on the pages immediately following the bibliography, and be clearly identified and in order. The legend of each table or Figure must be followed by a heading and explanatory notes (e.g., definitions of abbreviations) in order to be understood and interpreted without resorting to the text.

Tables and figures must be presented after the legend section, individually, on separate pages, suitably and sequentially identified. Tables and figures must be individually numbered (separate Arabic numeration for tables and figures), on separate pages, and must be ordered in accordance with how they are referred in the text.

Photographs, illustrations or other originals such as radiographic images, must be converted into an electronic format (JPEG or TIFF) after digitalization and inserted into the file of tables and images. Since the final print is in black and white or in gray tones, colour graphs will only be accepted when the respective publication costs are provided by the authors.

Submission in electronic format

Papers submitted to the BBR must be sent by email to: bbr_office@alies.pt in electronic format. Any work may also be submitted by mail, in a CD or other electronic support, to the executive editor:

Luis Monteiro Rodrigues
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde - ULHT
Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL .

All supports must be duly identified with the name of the author, the title of the work and the date of submission. It is highly recommendable that the submitted texts, in Portuguese and English, have been previously checked for possible misspellings using the tools available from the program.

Previous requirements to submission

(a) Conflicts of interest

At the moment of submission, the authors of any submitted manuscript must declare in writing the existence of a conflict of interests or declare their inexistence. The potential conflict areas are described in the document: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available at URL: www.icmje.org).

(b) Previous authorization for submission

Before submitting a manuscript to the BBR, the authors must have in their ownership the following documents that could be requested by the editorial staff:

- declaration of interest by all co-authors;
- in clinical research works, the informed consent of each individual patient whose data or photographs are presented, even when attempts at hiding their respective identity have been made;
- authorization for use of previously published material;

(c) For any other missing indications in these instructions, please consult: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

The publication of any article in the BBR will only be authorized after reception of the respective document that concedes the Rights of Reproduction, signed by the author held responsible for the work.

-Texto - o texto deverá estruturado na forma tradicional, isto é, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Agradecimentos. São admitidas pequenas adaptações a esta estrutura (incluindo de sub-parágrafos em Material e Métodos, por exemplo) de acordo com a natureza do trabalho apresentado.

- Referências / Bibliografia - as referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. As referências devem ser apresentadas por numeração árabe, entre parênteses e a respectiva citação seguir o modelo adequado da respectiva fonte (artigo de jornal, livro, capítulo de livro, Internet, etc.).

Modelos:

Artigo

Vega KJ, Pina I, Krevsky. Heart transplantation is associated with increase risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:980-3.

Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Capítulo de Livro

Phipps SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.465-478.

Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factor in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. in: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Os nomes abreviados das publicações devem ser utilizados de acordo com o Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Sugere-se que a bibliografia dos artigos submetidos seja feita com apoio dum programa de citações tal como o EndNote (do Institute of Scientific Information). Entre os vários estilos disponíveis, o acima descrito corresponde ao da revista Nature.

-Legendas, Tabelas e Figuras

As legendas das Tabelas e Figuras devem ser reunidas na página imediatamente seguinte à da bibliografia, claramente identificadas e sequenciadas. A legenda de cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto.

As tabelas e figuras devem ser apresentadas após as legendas, de preferência em páginas separadas, por ordem, devidamente identificadas e sequenciadas. No texto devem ser mencionadas todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras), de acordo com a ordem em que são referidas no texto. Os originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como imagens radiográficas, devem ser convertidas em formato electrónico (JPEG ou TIFF) após digitalização e, inseridos no ficheiro de tabelas e imagens. Sendo a impressão final a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos a cores só são aceitáveis quando os respectivos custos de publicação forem suportados pelos autores.

Submissão em suporte electrónico

Os trabalhos submetidos à BBR devem ser enviados por via electrónica para bbr_office@alies.pt. Os trabalhos podem também ser submetidos por correio normal, em CD ou em outro suporte electrónico, ao cuidados do editor-executivo:

Luis Monteiro Rodrigues
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde - ULHT
Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL .

Todos os suportes devem estar devidamente identificados com o nome do 1º autor, o título do trabalho e a data de submissão. É altamente recomendável que os textos submetidos, em português e em inglês, tenham sido previamente submetidos à correcção ortográfica pelas ferramentas incluídas no programa editor de texto.

Requisitos prévios à submissão

(a) Conflitos de interesse

No momento da submissão, os autores de qualquer manuscrito submetido devem declarar expressamente por escrito a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

As potenciais áreas conflituais são referidas no documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: www.icmje.org).

(b) Autorizações prévias à submissão

Antes de submeter um manuscrito à BBR, os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- declaração de interesse de todos os co-autores;
- em trabalhos de investigação clínica o consentimento informado de cada paciente individual cujos dados são apresentados, ou presentes em fotografias, mesmo quando tiverem sido efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;

(c) Para quaisquer outras indicações omissas nestas instruções deve ser consultado o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

A publicação de qualquer artigo na BBR apenas será autorizada após recepção do respectivo documento de cedência de Direitos de Reprodução assinado pelo autor responsável.

Publication Ethics and Publication Malpractice Statement

Journal of Biomedical and Biopharmaceutical Research (BBR)

(composed using the Publishing ethics resource kit and in compliance with Elsevier recommendations)

Ethical guidelines for BBR journal publication

(These guidelines are based on existing Elsevier policies).

The publication of an article in the peer-reviewed journal Biomedical and Biopharmaceutical Research (BBR) is an important piece in the development of a coherent and respected network of knowledge. It is a direct reflection of the quality of the work of the authors and the institutions that support them. Peer-reviewed articles support and embody the scientific method. It is therefore important to agree upon standards of expected ethical behavior for all parties involved in the act of publishing: the author, the journal editor, the peer reviewer, the publisher and the society.

ALIES as publisher of the journal Biomedical and Biopharmaceutical Research (BBR) takes its duties of guardianship over all stages of publishing extremely seriously and we recognize our ethical and other responsibilities. We are committed to ensuring that advertising, reprint or other commercial revenue has no impact or influence on editorial decisions. In addition, the ALIES and Editorial Board will assist in communications with other journals and/or publishers where this is useful and necessary.

Duties of authors

(These guidelines are based on existing Elsevier policies).

Reporting standards

Authors of reports of original research should present an accurate account of the work performed as well as an objective discussion of its significance. Underlying data should be represented accurately in the paper. A paper should contain sufficient detail and references to permit others to replicate the work. Fraudulent or knowingly inaccurate statements constitute unethical behavior and are unacceptable.

Review and professional publication articles should also be accurate and objective, and editorial opinion works should be clearly identified as such.

Data access and retention

Authors may be asked to provide the raw data in connection with a paper for editorial review, and should be prepared to provide public access to such data, if practicable, and should in any event be prepared to retain such data for a reasonable time after publication.

Originality and plagiarism

The authors should ensure that they have written entirely original works, and if the authors have used the work and/or words of others, that this has been appropriately cited or quoted. Plagiarism takes many forms, from passing off another's paper as the authors own paper, to copying or paraphrasing substantial parts of another's paper (without attribution), to claiming results from research conducted by others. Plagiarism in all its forms constitutes unethical publishing behavior and is unacceptable.

Multiple, redundant or concurrent publication

An author should not in general publish manuscripts describing essentially the same research in more than one journal or primary publication. Submitting the same manuscript to more than one journal concurrently constitutes unethical publishing behavior and is unacceptable. In general, an author should not submit for consideration in another journal a previously published paper. Publication of some kinds of articles (e.g. clinical guidelines, translations) in more than one journal is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. The authors and editors of the journals concerned must agree to the secondary publication, which must reflect the same data and interpretation of the primary document. The primary reference must be cited in the secondary publication.

Acknowledgement of sources

Proper acknowledgment of the work of others must always be given. Authors should cite publications that have been influential in determining the nature of the reported work. Information obtained privately, as in conversation, correspondence, or discussion with third parties, must not be used or reported without explicit, written permission from the source. Information obtained in the course of confidential services, such as refereeing manuscripts or grant applications, must not be used without the explicit written permission of the author of the work involved in these services.

Authorship of the paper

Authorship should be limited to those who have made a significant contribution to the conception, design, execution, or interpretation of the reported study. All those who have made significant contributions should be listed as co-authors. Where there are others who have participated in certain substantive aspects of the research project, they should be acknowledged or listed as contributors. The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors and no inappropriate co-authors are included on the paper, and that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and have agreed to its submission for publication.

Author Contributions Statement

Specify the contribution(s) of each author. For example, AB, conceptualization and study design; BC and CD, experimental implementation; BC, and DE, data analysis; AB and CD, drafting, editing and reviewing; DE, figures and graphics; AB, supervision and final writing. Additional categories of contribution may be defined as needed.

Hazards and human or animal subjects

If the work involves chemicals, procedures or equipment that have any unusual hazards inherent in their use, the author must clearly identify these in the manuscript. If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the manuscript contains a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and that the appropriate institutional committee(s) has approved them. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Disclosure and conflicts of interest

All authors should disclose in their manuscript any financial or other substantive conflict of interest that might be construed to influence the results or interpretation of their manuscript. All sources of financial support for the project should be disclosed. Examples of potential conflicts of interest which should be disclosed include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Potential conflicts of interest should be disclosed at the earliest stage possible.

Declaração de ética e boas práticas de publicação

Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica (BBR)

(Os aspectos éticos da publicação no BBR estão em consonância com as Diretrizes do Publishing Ethics Resource Kit (PERK) e em conformidade com as recomendações da Elsevier)

Directrizes Éticas para publicação no jornal BBR

(Estas directrizes baseiam-se em políticas da Elsevier existentes).

A publicação de um artigo na revista revisada por pares Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research (BBR) é um modelo essencial no desenvolvimento de uma rede coerente e respeitada de conhecimento. É um reflexo direto da qualidade do trabalho dos autores e das instituições que os apoiam. Os artigos revisados por pares apoiam e suportam o método científico. Portanto, é necessário chegar a acordo sobre os padrões de comportamento ético esperado para todas as partes envolvidas no ato de publicação: o autor, o editor da revista, o revisor, o editor e para a sociedade.

AALIES como editora do Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica (BBR) leva os seus deveres de tutela sobre todas as etapas da publicação extremamente a sério e reconhecemos as nossas responsabilidades éticas e outras. Estamos empenhados em garantir que a publicidade, reimpressão ou outras receitas comerciais não tenham qualquer impacto ou influência sobre as decisões editoriais. Além disso, a ALIES e o Conselho Editorial vão ajudar na comunicação com outros jornais e/ou editores onde isto é útil e necessário.

Deveres dos Autores:

(Estas directrizes baseiam-se em políticas da Elsevier existentes).

Atendimentos às normas de Submissão

Os autores dos manuscritos deverão apresentar um relato preciso do trabalho realizado, bem como uma discussão objetiva do seu significado. Os dados subjacentes devem ser representados com precisão no manuscrito. Um manuscrito deve conter detalhes e referências suficientes para permitir que outros possam replicar o trabalho. Declarações fraudulentas ou intencionalmente imprecisas constituem um comportamento antiético e são inaceitáveis.

Revisões e artigos de publicações profissionais também devem ser precisos e objetivos, e as obras de opinião editoriais devem ser claramente identificados como tal.

Acesso a Dados e Retenção

Os autores poderão ser convidados a fornecer os dados brutos em conexão com um manuscrito de revisão editorial, e devem estar preparados para fornecer o acesso público a esses dados, se possível, e em qualquer caso estarem preparados para manter esses dados por um período de tempo razoável após a publicação

Originalidade e plágio

Os autores devem garantir que as obras escritas sejam totalmente originais, e se os autores usaram o trabalho e / ou palavras de outros, estas devem ser devidamente citadas. O plágio assume muitas formas, o de fazer passar o manuscrito de outro, como o manuscrito do próprio autor, ao de copiar ou parafrasear partes substanciais de outro manuscrito (sem atribuição), para reivindicar os resultados de pesquisas realizadas por outras pessoas. O plágio em todas as suas formas constitui um comportamento de publicação antiético e é inaceitável.

Publicações múltiplas, redundantes ou concomitantes

Um autor não deve, em geral, publicar manuscritos que descrevem essencialmente a mesma pesquisa em mais de um jornal ou publicação primária. A apresentação do mesmo manuscrito em mais de uma publicação periódica constitui simultaneamente o comportamento antiético de publicação e é inaceitável. Em geral, um autor não deve submeter à consideração em outra revista um artigo publicado anteriormente. A publicação de alguns tipos de artigos (por exemplo, diretrizes clínicas, traduções) em mais de um jornal é, por vezes justificável, desde que estejam reunidas certas condições. Os autores e os editores do jornal em questão devem concordar com a publicação secundária, que deve refletir os dados e sua interpretação do documento primário. A referência principal deve ser citada na publicação secundária.

Reconhecimento das Fontes

Deve ser sempre dado destaque adequado do trabalho dos outros. Os autores devem citar as publicações que têm sido influentes na determinação da natureza do trabalho relatado. As informações obtidas em particular, como em uma conversa, correspondência, ou discussão com terceiros, não devem ser utilizadas ou relatadas, sem permissão explícita, por escrito da fonte. As informações obtidas no curso de serviços confidenciais, tais como manuscritos de arbitragem ou candidaturas de bolsas, não devem ser utilizadas sem a permissão explícita por escrito do autor do trabalho envolvido nestes serviços.

Autoria do Manuscrito

A autoria deve ser limitada àqueles que fizeram uma contribuição significativa para a concepção, projeto, execução ou interpretação do estudo relatado. Todos aqueles que fizeram contribuições significativas devem ser listados como co-autores. Onde há outras pessoas que tenham participado em certos aspectos substantivos do projeto de pesquisa, devem ser reconhecidas ou listadas como contribuidores.

O autor correspondente deve garantir que todos os co-autores apropriados e não co-autores inapropriados estão incluídos no manuscrito e que todos os co-autores viram e aprovaram a versão final do estudo e concordaram com a sua submissão para publicação.

Declaração sobre as contribuições do autor

Especifique a(s) contribuição(ões) de cada autor. Por exemplo, AB, concepção e desenho do estudo; BC e CD, implementação experimental; BC e DE, análise de dados; AB e CD, redação, edição e revisão; DE, figuras e gráficos; AB, supervisão e redação final. Outras categorias de contribuição adicional podem ser definidas conforme necessário.

Riscos para os seres humanos ou animais

Se o trabalho envolve produtos químicos, procedimentos ou equipamentos que têm quaisquer perigos incomuns inerentes à sua utilização, o autor deve identificá-los claramente no manuscrito. Se o trabalho envolve o uso de animais ou seres humanos, o autor deve assegurar que o manuscrito contém uma declaração em que todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as leis e directrizes institucionais e que o comité institucional adequado (s) tenha aprovado.

Os autores devem incluir uma declaração no manuscrito que informe que o consentimento foi obtido para a experimentação com seres humanos. Os direitos de privacidade dos seres humanos deve ser sempre observado.

Divulgação e Conflitos de Interesse

Todos os autores devem divulgar no seu manuscrito qualquer conflito de fundo financeiro ou outro interesse que possa ser interpretado de forma a influenciar os resultados ou interpretação do seu manuscrito. Todas as fontes de apoio financeiro para o projeto devem ser divulgadas. Exemplos de potenciais conflitos de interesse que devem ser divulgados incluem emprego, consultoria, propriedade de ações, honorários, depoimento de

Fundamental errors in published works

When an author discovers a significant error or inaccuracy in his/her own published work, it is the authors obligation to promptly notify the journal editor or publisher and cooperate with the editor to retract or correct the paper. If the editor or the publisher learns from a third party that a published work contains a significant error, it is the obligation of the author to promptly retract or correct the paper or provide evidence to the editor of the correctness of the original paper.

Duties of the Editorial Board

(These guidelines are based on existing Elsevier policies and COPE's Best Practice Guidelines for Journal Editors.)

Publication decisions

The editor of peer-reviewed journal Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal (BBR) is responsible for deciding which of the articles submitted to the journal should be published. The validation of the work in question and its importance to researchers and readers must always drive such decisions. The editor may be guided by the policies of the journal's editorial board and constrained by such legal requirements as shall then be in force regarding libel, copyright infringement and plagiarism. The editor may confer with other editors or reviewers in making this decision.

Fair play

An editor should evaluate manuscripts for their intellectual content without regard to race, gender, sexual orientation, religious belief, ethnic origin, citizenship, or political philosophy of the authors.

Confidentiality

The editor and any editorial staff must not disclose any information about a submitted manuscript to anyone other than the corresponding author, reviewers, potential reviewers, other editorial advisers, and the publisher, as appropriate.

Disclosure and conflicts of interest

Unpublished materials disclosed in a submitted manuscript must not be used in an editor's own research without the express written consent of the author. Privileged information or ideas obtained through peer review must be kept confidential and not used for personal advantage. Editors should recuse themselves (i.e. should ask a co-editor, associate editor or other member of the editorial board instead to review and consider) from considering manuscripts in which they have conflicts of interest resulting from competitive, collaborative, or other relationships or connections with any of the authors, companies, or (possibly) institutions connected to the papers. Editors should require all contributors to disclose relevant competing interests and publish corrections if competing interests are revealed after publication. If needed, other appropriate action should be taken, such as the publication of a retraction or expression of concern.

Involvement and cooperation in investigations

An editor should take reasonably responsive measures when ethical complaints have been presented concerning a submitted manuscript or published paper, in conjunction with the publisher (or society). Such measures will generally include contacting the author of the manuscript or paper and giving due consideration of the respective complaint or claims made, but may also include further communications to the relevant institutions and research bodies, and if the complaint is upheld, the publication of a correction, retraction, expression of concern, or other note, as may be relevant. Every reported act of unethical publishing behavior must be looked into, even if it is discovered years after publication.

Duties of reviewers

(These guidelines are based on existing Elsevier policies and COPE's Best Practice Guidelines for Journal Editors.)

Contribution to editorial decisions

Peer review assists the editor in making editorial decisions and through the editorial communications with the author may also assist the author in improving the paper. Peer review is an essential component of formal scholarly communication, and lies at the heart of the scientific method. Elsevier shares the view of many that all scholars who wish to contribute to publications have an obligation to do a fair share of reviewing.

Promptness

Any selected referee who feels unqualified to review the research reported in a manuscript or knows that its prompt review will be impossible should notify the editor and excuse himself from the review process.

Confidentiality

Any manuscripts received for review must be treated as confidential documents. They must not be shown to or discussed with others except as authorized by the editor.

Standards of objectivity

Reviews should be conducted objectively. Personal criticism of the author is inappropriate. Referees should express their views clearly with supporting arguments.

Acknowledgement of sources

Reviewers should identify relevant published work that has not been cited by the authors. Any statement that an observation, derivation, or argument had been previously reported should be accompanied by the relevant citation. A reviewer should also call to the editor's attention any substantial similarity or overlap between the manuscript under consideration and any other published paper of which they have personal knowledge.

Disclosure and conflict of interest

Unpublished materials disclosed in a submitted manuscript must not be used in a reviewer's own research without the express written consent of the author. Privileged information or ideas obtained through peer review must be kept confidential and not used for personal advantage. Reviewers should not consider manuscripts in which they have conflicts of interest resulting from competitive, collaborative, or other relationships or connections with any of the authors, companies, or institutions connected to the papers.

um especialista pago, pedidos de patente / inscrições e doações ou outras fontes de financiamento. Potenciais conflitos de interesse devem ser divulgados o mais cedo possível.

Erros fundamentais em trabalhos publicados

Quando um autor descobre um erro significativo ou imprecisão no seu / sua própria obra publicada, é obrigação do autor, notificar imediatamente o editor da revista ou editora e colaborar com o editor para retratar ou corrigir o manuscrito. Se o editor identificou a partir de um terceiro que um trabalho publicado contém um erro significativo, é obrigação do autor retirar prontamente ou corrigir o manuscrito ou fornecer evidências ao editor da correção do trabalho original.

Deveres do Conselho Editorial

(Estas directrizes baseiam-se em políticas existentes da Elsevier e na COPE's Best Practice Guidelines for Journal Editors.)

Decisões de publicação

O editor do Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica (BBR) é o responsável por decidir quais os artigos submetidos pelos autores e recomendados pelos avaliadores à revista que devem ser publicados. A validação do trabalho em questão e a sua importância para os investigadores e leitores deve sempre conduzir a tais decisões. O editor pode ser guiado pelas políticas do conselho editorial da BBR, sem que haja qualquer tipo de constrangimento por tais requisitos legais, como por exemplo, difamação, violação de direitos autorais e plágio. O editor pode também consultar o conselho editorial ou outros revisores para tomar essa decisão.

Jogo limpo

O editor, em momento algum, avaliará os manuscritos e o seu conteúdo intelectual fazendo distinção de raça, sexo, orientação sexual, crença religiosa, origem étnica, nacionalidade, ou a filosofia política dos autores.

Confidencialidade

O editor e/ou qualquer membro da equipa editorial jamais divulgará qualquer informação sobre um manuscrito submetido que não seja o autor correspondente, os revisores, os potenciais revisores, outros conselheiros editoriais, e do editor, conforme o caso.

Divulgação e os conflitos de interesse

Os materiais inéditos divulgados num artigo submetido não devem ser usados na pesquisa própria de um editor sem o expresso consentimento por escrito do autor. Informações privilegiadas ou ideias obtidas por meio de revisão por pares devem ser mantidas em sigilo e não serem usadas para proveito pessoal. Os editores devem abster-se (ou seja, devem perguntar a um co-editor, editor associado ou outro membro do conselho editorial em vez de revisar e considerar) de considerar os manuscritos em que têm conflitos de interesse resultantes da concorrência, colaboração ou outras relações ou conexões com qualquer um dos autores, empresas ou (possivelmente) instituições ligadas aos manuscritos. Os editores devem exigir a todos os contribuintes, para divulgar interesses concorrentes relevantes e publicar correções, se interesses conflitantes são revelados após a publicação. Se necessário, devem ser tomadas outras medidas adequadas, tais como a publicação de uma retratação ou expressão de preocupação.

Envolvimento e cooperação na investigação

Um editor deve tomar medidas razoáveis nas respostas quando forem apresentadas denúncias éticas sobre um manuscrito submetido ou artigo publicado, em conjunto com o editor (ou a sociedade). Essas medidas devem incluir em geral o contacto com o autor do manuscrito e com a devida consideração da respectiva queixa ou reivindicações feitas, mas pode também incluir outras comunicações para as instituições e órgãos de pesquisa, e se a queixa for mantida, a publicação de uma correção, retração, expressão de preocupação, ou outra nota, pode ser relevante.

Todo o ato relatado de comportamento antiético de publicação deve ser analisado, mesmo se for descoberto anos após a publicação.

Deveres dos revisores

(Estas directrizes baseiam-se em políticas existentes da Elsevier e na COPE's Best Practice Guidelines for Journal Editors.)

Contribuição para as decisões editoriais

A revisão por pares auxilia o editor a tomar decisões editoriais e através das comunicações editoriais com o autor também podem ajudar o autor a melhorar o manuscrito. A revisão por pares é uma componente essencial da comunicação científica formal, e está no cerne do método científico. A Elsevier partilha a opinião de muitos que todos os estudiosos que desejam contribuir nas publicações têm a obrigação de contribuir com a sua parte na revisão.

Prontidão

Qualquer revisor – avaliador selecionado que se sinta incompetente para avaliar e emitir o seu parecer acerca de um manuscrito ou sabe que a sua imediata revisão será impossível por outros motivos além daqueles que possam envolver conflito de interesse, deverá notificar o editor para que o mesmo seja liberado do processo de revisão.

Confidencialidade

Quaisquer trabalhos recebidos para análise devem ser tratados como documentos confidenciais. Estes trabalhos não devem ser mostrados ou discutidos com outros, exceto quando autorizado pelo editor.

Padrões de objetividade

Os comentários devem ser conduzidos de forma objetiva. A crítica pessoal do autor é inadequada. Os Revisores - Avaliadores devem expressar as suas opiniões claramente com o devido argumento.

Reconhecimento das fontes

Os Revisores - Avaliadores devem identificar os trabalhos relevantes publicados que não tenham sido citados pelos autores. Qualquer afirmação de que uma observação, derivação, ou argumento tenha sido relatado anteriormente deve ser acompanhada da citação relevante. Um Revisor - Avaliador também deve chamar a atenção do editor de qualquer semelhança substancial ou de sobreposição entre o manuscrito em consideração e qualquer outro trabalho publicado de que tenham conhecimento pessoal, evitando assim, o plágio.

Divulgação e conflito de interesses

Os materiais inéditos divulgados num manuscrito submetido não devem ser usados na própria investigação dos revisores, sem o expresso consentimento por escrito do autor. As informações privilegiadas ou ideias obtidas por meio de revisão por pares devem ser mantidas em sigilo e não devem ser usadas para proveito pessoal. Os Revisores - Avaliadores não devem considerar os manuscritos em que têm conflitos de interesse resultantes da competitividade, colaboração, ou outros relacionamentos ou ligações com qualquer um dos autores, empresas ou instituições ligadas aos manuscritos.



Luís Monteiro Rodrigues

Editor

Editorial

Vol 16: Number 2
(Vol 16: Número 2)

This number in brief

The **Nutrition and Food Sciences section** includes two sequential papers regarding the anthropometric evaluation of pre-school and school age children from the Canarian Islands (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16) 2; 154-164 DOI:10.19277/bbr.16.2.207) and from Azores (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16) 2; 165-175 DOI:10.19277/bbr.16.2.208). These two cross-sectional studies focus the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in those age groups, completing similar information published in the last issue of our journal in reference to the Madeiran Islands. A complete characterization of this condition is now achieved and described for the entire European Macaronesian islands, underlining the originality and interest of these papers.

The next original study approaches the body image perception, currently related to extreme thinness in women and a muscular body in men, in a convenience sample of university students from Universidade Lusófona in Lisboa (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 176-183 DOI:10.19277/bbr.16.2.209).

Closing this section the Clinical Case category includes an interesting analysis report concerning Food Allergy. This common condition is not so often life threatening, but is capable to induce permanent damage (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 184-187 DOI:10.19277/bbr.16.2.210).

The **Biomedical Sciences section** begins with an original paper focusing the biomechanical properties of human in vivo skin, a topic addressed previously in this journal. This study explores a new device that quantifies viscoelasticity by using a negative pressure. The resulting displacement is here converted into texture analysis parameters such as entropy, contrast, correlation, energy, and homogeneity, providing a new insight into these characteristics of human skin (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 188-194 DOI:10.19277/bbr.16.2.211).

The next research paper provides continuity to a regular topic in our journal involving microcirculatory physiology and vascular medicine. This time the aim is to evaluate the impact of the basic movement of walking, using the "step in place model" on the foot microcirculation (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 195-201 DOI:10.19277/bbr.16.2.212).

The **Biopharmaceutical Sciences section** begins with a not frequently addressed but very important topic – pharmacovigilance. This observational retrospective longitudinal study compares the PRAC (Pharmacovigilance Risk Assessment

Este número em breves palavras

A **secção Nutrição e Ciências da Nutrição** é iniciada com dois documentos sequenciais sobre a avaliação antropométrica de crianças em idade pré-escolar e escolar das Ilhas Canárias (Biomed & Biopharm Research, 2019; (16) 2; 154-164 DOI:10.19277/bbr.16.2.207) e dos Açores (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 165-175 DOI:10.19277/bbr.16.2.208). Esses dois estudos transversais focam a prevalência de peso (normal, sobrepeso e obesidade) nessas faixas etárias, completando informações semelhantes publicadas no número anterior do nosso jornal obtidas nas Ilhas da Madeira. Uma caracterização completa dessa condição é agora alcançada e descrita para todas as ilhas da Macaronésia Europeia sublinhando a originalidade e o interesse destes artigos.

O estudo original que se segue, aborda a percepção da imagem corporal, atualmente relacionada à magreza extrema em mulheres e a um corpo musculdo nos homens, numa amostra de conveniência de estudantes da Universidade Lusófona em Lisboa (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 176-183 DOI:10.19277/bbr.16.2.209).

Fechando esta seção, o Caso Clínico inclui um interessante relatório de análise sobre a Alergia Alimentar uma condição comum, não tão frequentemente fatal, mas capaz de induzir danos graves e até permanentes (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 184-187 DOI:10.19277/bbr.16.2.210).

A **secção Ciências Biomédicas** começa com um artigo original focando as propriedades biomecânicas da pele humana in vivo, um tópico já antes abordado nesta revista. Este estudo explora um novo dispositivo que quantifica a viscoelasticidade usando uma pressão negativa. O deslocamento resultante é aqui convertido em parâmetros de análise de textura, como entropia, contraste, correlação, energia, homogeneidade, fornecendo uma nova visão dessas características da pele humana (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 188-194 DOI:10.19277/bbr.16.2.211).

O artigo de investigação que se segue continua um tema que assume bastante regularidade nesta nossa revista, respeitando a fisiologia microcirculatória e a medicina vascular. Desta vez, o objetivo é avaliar o impacto do movimento básico da marcha na microcirculação do pé, usando o modelo "step in place" (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 195-201 DOI:10.19277/bbr.16.2.212).

A **secção de Ciências Biofarmacêuticas** começa com um tema que não abordamos frequentemente, mas nem por isso menos importante – a farmacovigilância. Este estudo longitudinal retrospectivo observacional compara os sinais publicados pelo

Committee) published signals from 2012 to 2018, comparing biological and conventional medicines (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 202-212 DOI:10.19277/bbr.16.2.213).

The following paper, also an original research paper, addresses an important aspect of cosmetic formulation, how the choice of raw materials can contribute to improve its sensorial properties. This paper describes the physical-mechanical properties of certain polymers applied in cosmetic formulation and analyzes how their concentrations influence relevant evaluation parameters (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 213-222 DOI:10.19277/bbr.16.2.214).

Closing this section is another original research paper from modern pharmaceutical technology. Its objective is to look deeper into licofelone, a novel cyclooxygenase-lipoxygenase dual inhibitor to understand its advantages in terms of gastric tolerability over conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 223-233 DOI:10.19277/bbr.16.2.215).

Finally, this issue also includes four additional Supplements only available in the online version. These include the Minutes / Proceedings and Abstract Books of several important meetings supported by our journal, respectively, the Fascination of Plants Day held in Lisboa in May at U Lusofona (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.216), the 1st Bioactive Natural Products Research Meeting held in Lisboa in September at U Lusofona (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.217) the Proceedings of the Physioma 2019 – The 1st International Meeting of the Portuguese Society of Physiology, held in Lisboa in October at ISCTE IUL (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.218) and the CBIOS - the Lusofona's Research Center for Bioscience and Health Technologies, Science Sessions synopsis (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.219).

PRAC (Comitê de Farmacovigilância para a Avaliação de Risco) de 2012 a 2018, comparando medicamentos biológicos e convencionais (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 202-212 DOI:10.19277/bbr.16.2.213).

O artigo seguinte, igualmente um trabalho de investigação original, aborda como a escolha de matérias-primas pode contribuir para melhorar as propriedades sensoriais um aspecto importante da formulação cosmética. Este artigo descreve as propriedades físico-mecânicas de alguns polímeros aplicados nas formulações cosméticas e analisa como sua concentração influencia parâmetros de avaliação relevantes (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 213-222 DOI:10.19277/bbr.16.2.214).

Para encerrar esta seção, incluímos um outro trabalho de investigação original, ilustrando a mais moderna tecnologia farmacêutica. O objetivo é o aprofundamento do conhecimento sobre a licofelona, um novo inibidor duplo da ciclooxigenase-lipoxygenase para melhor perceber as potenciais vantagens, sobretudo em termos de tolerância gástrica, sobre os anti-inflamatórios não esteróides convencionais (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; 223-233 DOI:10.19277/bbr.16.2.215).

Por fim, este número inclui ainda quatro suplementos adicionais disponíveis apenas na versão online. Dizem respeito às Atas / Sinopses e Livros de Resumos de várias reuniões importantes apoiadas pela nossa revista, respetivamente, o Livro de Resumos do Dia do Fascínio das Plantas, realizado em Lisboa, em Maio - U Lusofona (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.216), o Livros de Resumos da I Reunião de Investigação de Produtos Naturais Bioativos realizada em Lisboa, em Setembro - U Lusofona (Biomed & Biopharm Research, 2018;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.217), o Livros de Resumos do Physioma 2019 - 1º Encontro Internacional da Sociedade Portuguesa de Fisiologia, realizado em Lisboa, em Outubro - ISCTE IUL (Biomed & Biopharm Research, 2019;(16)2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.218) e as Atas das Sessões Científicas do CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusofona, (Biomed & Biopharm Research, 2019; (16) 2; DOI: 10.19277/bbr.16.2.219).

~

Anthropometric evaluation of children aged between 3 and 9 years from the Canary Islands

Avaliação antropométrica de crianças entre os 3 e os 9 anos de idade das ilhas Canárias

Cíntia Ferreira-Pêgo¹, Elizabeth Galván², Silvia Morales², Joaquim Fábregas², Yazmina Martín², Nelson Tavares¹

¹CBIOS Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

²ICSE - Centro Integrado de Educación Superior, Calle Franchy Roca 28, 35007, Las Palmas de Gran Canaria, Spain
Email: nelson.tavares@ulusofona.pt

Abstract

Obesity was declared as a global epidemic, as it affected more and more countries worldwide. Recent evidence has shown that the rates of overweight/ obesity have reached wide-ranging proportions in children under the age of 5 years, making it one of the most serious global public health challenges of the 21st century.

A cross-sectional analysis to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in pre-school and school children from Canary Island was designed. The final sample size analyzed included 1007 participants aged between 3 and 9 years old.

Girls were significantly more overweight and obese than boys at age 4, and more overweight, but not obese, at age 9. The odds ratio of presenting overweight or obesity were significantly higher for girls and later in childhood (in total population and both genders separately) in the fully-adjusted model. Further studies are needed to understand the behaviors leading to this condition, mainly in girls.

These results emphasize the importance of nutritional education programs, even in young children, to improve the eating choices and consequently reducing childhood obesity.

Keywords: obesity, overweight, children, Canary Island, Spain

Resumo

A obesidade foi declarada epidemia global, já que começou a afetar cada vez mais países ao redor do mundo. As recentes evidências demonstraram que as taxas de excesso de peso/obesidade atingiram elevadas proporções em crianças menores de 5 anos, tornando-o um dos mais sérios desafios de saúde pública global do século XXI.

O presente trabalho consiste numa análise transversal com o principal objetivo de avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade em crianças em idade pré-escolar e escolar das Ilhas Canárias. O tamanho final da amostra analisada incluiu 1007 participantes com idades entre 3 e 9 anos.

As raparigas apresentaram significativamente maior excesso de peso e obesidade do que os rapazes aos 4 anos de idade, e excesso de peso, mas não obesidade, aos 9 anos. A odds ratio de excesso de peso e obesidade foi significativamente maior para as raparigas e crianças mais velhas (na população total e ambos sexos separadamente).

Estes resultados enfatizam a importância da existência de programas de educação nutricional, mesmo em crianças jovens, de forma a melhorar as escolhas alimentares e, consequentemente, reduzir a taxa de obesidade infantil.

Palavras-chave: obesidade, excesso de peso, crianças, Ilhas Canárias, Espanha

Introduction

In 2000, the World Health Organization (WHO) warned in its annual report that obesity incidence could become an emerging public health problem (1), and in 2003 declared it as a global epidemic as it affected more and more countries worldwide (2). Rates of overweight / obesity have reached wide-ranging proportions in children under the age of 5 years (3), which became a serious global public health challenge of the 21st century based on recent evidence. In line with this assumption, the WHO reported that more than 38 million children of this age group were classified as overweight or obese in 2017 (4). Additionally, the latest WHO report (from 2018) states that in 2016 over 340 million children aged 5-19 years had excess of weight (5). Particularly in Spain, childhood overweight and obesity is worrying considering the latest published data indicated it had one of the highest prevalence in Europe (6). About 39% of Spanish children and adolescents, aged between 8 and 17, are overweight or obese (7) and 16.5% present abdominal obesity (8). This means that practically one in two children presents a higher weight than that recommended by WHO.

Specifically in the Canary Islands, 32.8% of individuals aged between 2 and 24 years old presented overweight, and 18% of them presented as being obese (9), placing it as the Spanish autonomous community with one of the highest rate of childhood obesity (10).

Childhood obesity is of concern not only due to the increased prevalence in worldwide populations but also due to its multiple health consequences, including increased risk factors for cardiovascular and metabolic diseases development (11), with an impact in obesity on adulthood (12), with psychosocial consequences during childhood (12,13) ultimately affecting global physical health (13). For all these reasons, the main objective of the present study was to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obesity of a sample of children aged between 3 and 9 years old from the Canary Islands.

Introdução

Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) alertou no seu relatório anual que a incidência de obesidade poderia vir a tornar-se um problema emergente de saúde pública (1) e, em 2003, declarou-a como uma epidemia global, já que começou a afetar cada vez mais países mundiais (2). As recentes evidências demonstraram que as taxas de excesso de peso/obesidade atingiram grandes proporções em crianças menores de 5 anos (3), tornando-o um dos mais sérios desafios de saúde pública global do século XXI. De acordo com essa premissa, a OMS relatou que mais de 38 milhões de crianças dessa faixa etária foram classificadas como sofrendo de excesso de peso ou obesidade em 2017 (4). É importante ressaltar também que o último relatório da OMS de 2018 mostra que, em 2016, mais de 340 milhões de crianças de entre 5 a 19 anos de idade apresentavam excesso de peso (5).

Particularmente em Espanha, o sobrepeso e a obesidade infantil são especialmente preocupantes tendo em consideração os últimos dados publicados, sendo dos níveis mais elevados da Europa (6). Cerca de 39% das crianças e adolescentes espanhóis, com idades entre os 8 e 17 anos, apresentam excesso de peso ou obesidade (7) e 16,5% apresentam obesidade abdominal (8). Isso significa que praticamente uma em cada duas crianças apresenta peso superior ao recomendado pela OMS.

Especificamente nas Ilhas Canárias, 32,8% dos indivíduos com idade entre os 2 e 24 anos apresentam excesso de peso, sendo 18% de obesos (9), colocando-a como a comunidade autónoma com um dos maiores índices de obesidade infantil de todo o território espanhol (10). A obesidade infantil é extremamente preocupante não só apenas devido ao aumento da prevalência da doença em vários países, mas também devido às múltiplas consequências para a saúde a curto, médio e longo prazo, como o aumento dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (11), aumentando da possibilidade de apresentar obesidade na idade adulta (12), levando à presença de consequências psicossociais na infância (12,13), afetando finalmente a saúde física no geral (13). Por todas essas razões, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade de uma amostra de crianças de 3 a 9 anos de idade das ilhas Canárias.

Material and Methods

Design and study population

The present study is a cross-sectional analysis designed to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in pre-school and school children from Canary Island.

The participants aged between 3 and 9 years and were recruited from private schools from Gran Canaria island. The children's inclusion criteria involved written parental consent (following the Declaration of Helsinki), not being sick and being present on the scheduled visit day. The evaluations took place during the 2018/2019 school year. The effective sample size of the present work was 1007 participants.

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 head positioned so that the gaze remained horizontal, according to the Frankfurt plane (16). The value was recorded to the nearest millimeter (0.1 cm). All the participants wore light clothing and no shoes during the measurements. BMI was afterward calculated from the measurements obtained in each child using the normalized formula [Weight (in kg)/Height² (in m)] (14). 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 are presented either as means and standard deviation (SD) for continuous variables or numbers and percentages for dichotomous variables. We compared the distribution of the selected characteristics between groups using Pearson 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 BMI ≥ 25 kg/m² (dependent variable) and gender (two categories), age (years) or age categories (seven categories) as exposure. The models were adjusted for gender, age, and school origin, ex-

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo é uma análise transversal com o objetivo de avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade em crianças de idade pré-escolar e escolar das Ilhas Canárias.

Os participantes com idades entre os 3,00 e 9,99 anos foram recrutados em escolas de ensino privado da ilha de Gran Canaria. Nos critérios de inclusão das crianças constavam o consentimento por escrito dos pais (de acordo com a Declaração de Helsínquia), não apresentar doença aparente e estar presente no dia agendado para a visita. As avaliações ocorreram durante o ano letivo de 2018/2019. O tamanho efetivo da amostra do presente trabalho foi de 1007 participantes.

Avaliação dos dados antropométricos

O peso foi medido por profissionais treinados utilizando uma balança eletrônica, registrando o valor no decigrama mais próximo (0,1 kg) e a altura usando um estadiômetro calibrado. A estatura foi avaliada com as crianças em pé, de costas para o estadiômetro e com os pés e joelhos juntos, a cabeça posicionada para que o olhar permanecesse horizontal, de acordo com o plano de Frankfurt (16). O valor foi registrado 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)/Altura² (em m)] (14). Peso normal, excesso de peso 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 são apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou números (n) e percentagens (%) para variáveis dicotômicas. 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 excesso de peso e obesidade (variável dependente) e sexo (duas categorias), idade (anos) ou categorias de idade (sete categorias) como exposição. Os modelos foram ajustados para sexo, idade e proveniência escolar, exceto quando qualquer dessas variáveis fosse

cept 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 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

A total of 1007 children from the Canary Islands (522 boys and 485 girls) with a mean age of 6.65 (SD:1.94) years took part in the present analysis. The general characteristics of the studied population according to gender are summarized in Table 1. Statistical differences were found between both genders regarding height and

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 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

Um total de 1007 crianças das Ilhas Canárias (522 rapazes e 485 raparigas), com idade média de 6,65 anos (DP: 1,94), participaram nesta análise. As características gerais da população estudada de acordo com o sexo estão resumidas na Tabela 1. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os sexos em relação à estatura e peso, no entanto, essa variação significativa desapareceu quando o cálculo do IMC foi levado a cabo.

Table 1/ Tabela 1 - General characteristics of the study population categorized by gender./ Tabela 1. Características gerais da população estudada categorizada por sexo.

	All population/ População total (n=1007)	Boys/ Rapazes (n=522)	Girls/ Raparigas (n=485)	P- value ^a
Age/ Idade, years/ anos	6.65 (1.94)	6.73 (1.98)	6.57 (1.91)	0.185
Height/ Altura, m	1.22 (0.14)	1.23 (0.14)	1.21 (0.13)	0.005
Weight/ Peso, kg	26.06 (8.67)	26.66 (9.15)	25.39 (8.09)	0.020
BMI/ IMC, kg/m ²	17.11 (2.96)	17.16 (3.08)	17.05 (2.82)	0.574
Age categories/ Categorias de idade, % (n)				
3 years/ anos	10.96 (111)	11.24 (59)	10.66 (52)	
4 years/ anos	12.54 (127)	11.62 (61)	13.52 (66)	
5 years/ anos	11.65 (118)	11.82 (62)	11.48 (56)	
6 years/ anos	15.99 (162)	14.86 (78)	17.21 (84)	0.618
7 years/ anos	16.58 (168)	15.81 (83)	17.42 (85)	
8 years/ anos	17.87 (181)	18.28 (96)	17.42 (85)	
9 years/ anos	13.82 (140)	15.80 (83)	11.68 (57)	

Data expressed as means (SD) or percentages (n). Abbreviations: BMI, body mass index. a P values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson χ^2 as appropriate./ Dados expressos em média (DP) ou percentagens (n). Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal. a Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student ou Pearson χ^2 como apropriado.

Table 2/ Tabela 2 - Anthropometric measurements according to gender and age categories./ Dados antropométricos de acordo com o sexo e categorias de idade.

	All population/ População total	Boys/ Rapazes	Girls/ Raparigas	p-value ^a
3 years/ anos	(n= 111)	(n=59)	(n=52)	
Height/ Altura	1.01 (0.06)	1.01 (0.05)	1.01 (0.08)	0.935
Weight/ Peso	16.57 (2.44)	16.75 (2.14)	16.37 (2.75)	0.410
BMI/ IMC	16.20 (1.57)	16.39 (1.44)	15.97 (1.69)	0.155
4 years/ anos	(n=127)	(n=61)	(n=66)	
Height/ Altura	1.08 (0.08)	1.09 (0.05)	1.08 (0.09)	0.720
Weight/ Peso	18.70 (2.96)	18.71 (2.56)	18.68 (3.30)	0.953
BMI/ IMC	16.01 (2.35)	15.88 (1.76)	16.14 (2.80)	0.535
5 years/ anos	(n=118)	(n=62)	(n=56)	
Height/ Altura	1.14 (0.07)	1.16 (0.07)	1.13 (0.06)	0.014
Weight/ Peso	21.94 (4.67)	22.43 (4.86)	21.40 (4.42)	0.233
BMI/ IMC	16.59 (2.50)	16.53 (2.60)	16.65 (2.41)	0.785
6 years/ anos	(n=162)	(n=78)	(n=84)	
Height/ Altura	1.21 (0.06)	1.22 (0.06)	1.20 (0.06)	0.028
Weight/ Peso	24.23 (5.12)	24.53 (5.61)	23.95 (4.63)	0.476
BMI/ IMC	16.48 (2.51)	16.40 (2.53)	16.55 (2.51)	0.699
7 years/ anos	(n=168)	(n=83)	(n=85)	
Height/ Altura	1.27 (0.06)	1.27 (0.05)	1.26 (0.06)	0.172
Weight/ Peso	28.77 (6.11)	29.41 (6.30)	28.14 (5.88)	0.179
BMI/ IMC	17.80 (3.01)	18.02 (3.22)	17.57 (2.79)	0.337
8 years/ anos	(n=181)	(n=96)	(n=85)	
Height/ Altura	1.32 (0.07)	1.33 (0.07)	1.30 (0.07)	0.013
Weight/ Peso	30.72 (7.39)	31.51 (8.17)	29.81 (6.33)	0.123
BMI/ IMC	17.61 (3.34)	17.70 (3.72)	17.50 (2.87)	0.682
9 years/ anos	(n=140)	(n=83)	(n=57)	
Height/ Altura	1.39 (0.07)	1.39 (0.07)	1.38 (0.07)	0.469
Weight/ Peso	35.92 (8.98)	35.74 (9.41)	36.18 (8.39)	0.778
BMI/ IMC	18.47 (3.56)	18.26 (3.64)	18.79 (3.45)	0.389

Data expressed as means (SD). Height expressed in meters (m), weight in kilograms (kg) and BMI in kg/m². Abbreviations: BMI, body mass index. a P values for comparisons between groups were tested by Student's t-test./ Dados expresso como media (DP). Altura expressa em metros (m), peso em quilogramas (kg) e IMC em kg/m². Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal. a Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student.

weight, however, this significant variance disappeared when BMI was calculated.

Table 2 shows the anthropometric measurements for each age categories assessed, separated by gender. Boys were statistically taller than girls at ages 5, 6, and 8. No other differences were observed in additional parameters or age categories.

Girls were significantly more overweight and obese than boys at age 4 ($p=0.034$). Results, also observed in Table 3, indicate that girls at age 9 were more overweight than boys with the same age. However, boys were more obese (15.70%) than girls (10.50%) at the same age. Differences ($p=0.023$) were also found in total population (not subdivided by age categories) when

A Tabela 2 mostra as medidas antropométricas para cada faixa etária avaliada, separadas por sexo. Os rapazes demonstraram ser estatisticamente mais altos que as raparigas aos 5, 6 e 8 anos de idade. Nenhuma outra diferença foi observada nos restantes parâmetros ou categorias de idade.

As raparigas demonstraram apresentar significativamente maior excesso de peso e obesidade do que os rapazes aos 4 anos ($p = 0,034$). Outros resultados também observados na Tabela 3 indicaram que as crianças do sexo feminino com 9 anos apresentaram mais excesso de peso do que as crianças do sexo masculino com a mesma idade. No entanto, os rapazes foram mais obesos (15,70%) do que as raparigas (10,50%) na mesma idade. Também foram encontradas diferenças ($p = 0,023$) na população total (não subdivididas por categorias de idade) quando a análise foi realizada considerando-se o excesso de peso e obesidade na mesma categoria, demonstrando que as raparigas (30,90%) eram mais pesadas que os rapazes (25,10%) (dados não mostrados).

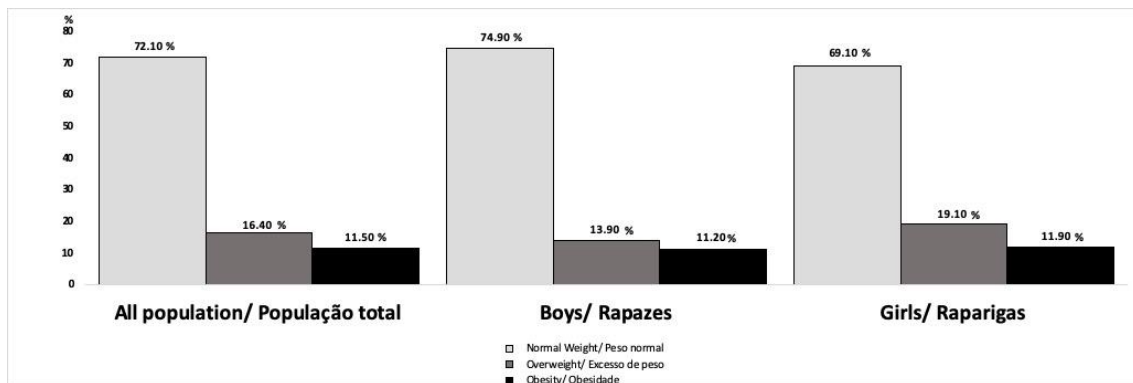


Figure 1/ Figura 1 - Percentage of individuals presenting normal weight, overweight and obesity, according to IOTF criteria categorized by gender/ Percentagem de indivíduos apresentando peso normal, excesso de peso ou obesidade de acordo com os critérios da IOTF categorizada por sexo.

Table 3/ Tabela 3 - Prevalence of normal weight, overweight and obesity according gender and age categories./ Prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade de acordo com o sexo e categorias de idade.

	All population/ População total	Boys/ Rapazes	Girls/ Raparigas	p-value ^a
3 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	86.50 (96)	86.40 (51)	86.50 (45)	
Overweight/ Excesso de peso	9.90 (11)	10.20 (6)	9.60 (5)	0.988
Obesity/ Obesidade	3.60 (4)	3.40 (2)	3.80 (2)	
4 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	81.10 (103)	88.50 (54)	74.20 (49)	
Overweight/ Excesso de peso	11.00 (14)	9.80 (6)	12.10 (8)	0.034
Obesity/ Obesidade	7.90 (10)	1.60 (1)	13.60 (9)	
5 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	69.50 (82)	75.80 (47)	62.50 (35)	
Overweight/ Excesso de peso	16.90 (20)	12.90 (8)	21.40 (12)	0.285
Obesity/ Obesidade	13.60 (16)	11.30 (7)	16.10 (9)	
6 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	74.70 (121)	79.50 (62)	70.20 (59)	
Overweight/ Excesso de peso	14.20 (23)	12.80 (10)	15.50 (13)	0.325
Obesity/ Obesidade	11.10 (18)	7.70 (6)	14.30 (12)	
7 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	62.50 (105)	61.40 (51)	63.50 (54)	
Overweight/ Excesso de peso	19.00 (32)	18.10 (15)	20.00 (17)	0.788
Obesity/ Obesidade	18.50 (31)	20.50 (17)	16.50 (14)	
8 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	70.70 (128)	69.80 (67)	71.80 (61)	
Overweight/ Excesso de peso	19.30 (35)	17.70 (17)	21.20 (18)	0.439
Obesity/ Obesidade	9.90 (18)	12.50 (12)	7.10 (6)	
9 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	65.00 (91)	71.10 (59)	56.10 (32)	
Overweight/ Excesso de peso	21.40 (30)	13.30 (11)	33.30 (19)	0.017
Obesity/ Obesidade	13.60 (19)	15.70 (13)	10.50 (6)	
TOTAL				
Normal Weight/ Peso normal	72.10 (726)	74.90 (391)	69.10 (335)	
Overweight/ Excesso de peso	16.40 (165)	14.00 (73)	19.00 (92)	0.076
Obesity/ Obesidade	11.50 (116)	11.10 (58)	12.00 (58)	

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 percentagem (n). a Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante Pearson χ^2 . b Peso normal, excesso de peso e obesidade foram categorizados de acordo com os critérios da IOTF (15).

the analysis was performed taking into consideration overweight and obesity in the same category (BMI ≥ 25 kg/m²), demonstrating that girls (30.90%) were heavier than boys (25.10%) (data not shown).

As shown in Figure 1, within the entire studied population the prevalence of overweight was 16.40% and obesity of 11.50%. Girls were not statistically more overweight (19.00%) and obese (12.00%) than boys (14.00% and 11.10%, respectively).

The odds ratio of presenting BMI higher than 25kg/m² (Table 4) were significantly higher for girls and later in childhood (in the total studied population and both genders separately) in the fully-adjusted model. Participants aged 5, 6, 7, 8 and 9 years presented a significantly higher risk of being overweight or obese when 3 year old children were considered as reference. Similar results were observed when only girls were analyzed, except for 8 years category. In the same line, boys analyzed individually at 7, 8 and 9 years of age showed a

Como mostra a Figura 1, a prevalência de excesso de peso na população total foi de 16,40% e obesidade de 11,50%. As raparigas apresentaram (não estatisticamente) maior excesso de peso (19,00%) e obesidade (12,00%) do que os rapazes (14,00% e 11,10%, respectivamente).

O odds ratio de apresentar IMC excesso de peso e obesidade (Tabela 4) foi significativamente maior para crianças do sexo feminino e crianças mais velhas (na população total e em ambos os sexos separadamente) no modelo mais ajustado. Participantes de 5, 6, 7, 8 e 9 anos apresentaram um risco significativamente maior de estar acima do peso recomendado, em comparação com as crianças de 3 anos. Resultados semelhantes foram observados quando apenas as raparigas foram analisadas, com exceção da categoria de 8 anos. Na mesma linha, quando os rapazes foram analisados individualmente, as categorias de 7, 8 e 9 anos apresentaram um risco estatisticamente maior de apresentar excesso de peso e obesidade, tendo em consideração os rapazes de 3 anos como referência.

Table 4/ Tabela 4 - Association (odds ratio) between presenting BMI>25kg/m² and gender or age categories./ Associação (odds ratio) entre apresentar IMC>25kg/m² e sexo ou categorias de idade.

Variables/ Variáveis	All population/ População total (n=1007)	Boys/ Rapazes (n=522)	Girls/ Raparigas (n=485)
Gender/ Sexo ^a	1.38 (1.04-1.83)	-	-
Age/ Idade	1.20 (1.11-1.29)	1.23 (1.10-1.37)	1.16 (1.05-1.29)
Age categories/ Categorias de idade			
3 years/ anos	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
4 years/ anos	1.50 (0.74-3.03)	0.84 (0.28-2.48)	2.21 (0.83-5.87)
5 years/ anos	2.75 (1.40-5.39)	2.02 (0.78-5.19)	3.73 (1.41-9.83)
6 years/ anos	2.13 (1.11-4.08)	1.62 (0.64-4.10)	2.70 (1.06-6.86)
7 years/ anos	3.74 (1.99-7.03)	3.97 (1.66-9.46)	3.48 (1.39-8.70)
8 years/ anos	2.69 (1.43-5.08)	2.76 (1.16-6.57)	2.50 (0.99-6.36)
9 years/ anos	3.64 (1.90-6.99)	2.65 (1.09-6.46)	4.98 (1.90-13.10)

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 school origin (except when gender or age were the independent variable)./ Dados expressos em OR (95% intervalo de confiança). a Sexo foi codificado como 0 para rapazes e 1 para raparigas. Modelo de regressão logística ajustada por sexo, idade e colégio (exceto quando sexo ou idade eram as variáveis independentes).

statistically higher risk of presenting BMI over 25 kg/m².

Discussion

The results of the present study indicate that girls and older childhood were more likely to be overweight or obese. In girls, each age category after 5 years is associated with presenting BMI ≥ 25 kg/m². Boys older than 7 years presented significantly more risk of higher weight than recommended.

The total prevalence of obesity and overweight observed in the present analysis was similar to those published in 2012 (6). However, more recently published results (2019) showed obesity prevalence values very low compared to ours (3). Still, the overweight prevalence was very similar to those published in the present document. These differences can be explained by the fact that Cadenas-Sanchez and coworkers assessed all the Spanish territory meanwhile we only evaluated Canary Island, which, as described previously, is the Spanish autonomous community with a higher prevalence of childhood obesity.

Taking into consideration age comparison, to the best of our knowledge, the present work is the first one to describe the relationship between age categories and the risk of overweight and obesity in Canary Island pre-school and school children.

Regarding gender evaluation, the results published until now are not so clear, since it seems to depend on the reference cut point used and also the type of population assessed. A recent article, confirming our results, found that girls are more overweight than boys in school-age (3). However, other older publications found that the overall prevalence of overweight, and obesity as well, was higher in boys than in girls (6,9,10). This seems to indicate a change in gender tendencies, and that while in the past the boys were heavier, now we need to pay more attention to girls. It was not the objective of the present work to evaluate these variables, thus further studies are needed to understand the behaviors leading to this condition. To the best of our knowledge, the present study is the first one to assess exclusively anthropometric data in children aged between 3 and 9 years old. These results emphasize the importance of nutritional education programs, even in young age, to improve the eating choices and consequently reducing childhood obesity. In this stage of life overweight is not associated with higher mortality rates in the short term, however, the risk increases in adult life. Follow-up studies in children and adolescents show that the likelihood of being obese in

Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que ser rapariga e ser mais velho apresentaram maior probabilidade de estar acima do peso recomendado. Após os 5 anos de idade, cada ano cumprido nas raparigas está associado a apresentar excesso de peso. Rapazes com mais de 7 anos apresentaram um risco significativamente maior de ter peso superior ao recomendado.

A prevalência total de obesidade e excesso de peso observada na presente análise foi semelhante à publicada em 2012 (6). No entanto, outros resultados publicados no presente ano de 2019 mostraram valores de prevalência de obesidade muito mais baixos em comparação com os observados por nós (3). Ainda assim, a prevalência de excesso de peso foi muito semelhante à publicada no presente documento. Essas diferenças podem ser explicadas pelo facto de os autores do trabalho avaliarem todo o território espanhol, enquanto nós somente avaliámos as Ilhas Canárias, que tal como descrito anteriormente, é a comunidade autónoma espanhola com maior prevalência de obesidade infantil.

Tendo em consideração a comparação etária, tanto quanto sabemos, o presente trabalho é o primeiro a descrever a relação entre categorias etárias e o risco de excesso de peso e obesidade em crianças pré-escolares e escolares das Ilhas Canárias.

Em relação à avaliação por sexo, os resultados publicados até o momento não são claros, pois parecem depender do ponto de corte de referência utilizado, assim como do tipo de população avaliada. Um artigo recente, que vem confirmar os nossos resultados, constatou que as raparigas têm um maior excesso de peso que os rapazes em idade escolar (3). No entanto, outros trabalhos anteriores relataram que a prevalência geral de excesso de peso e obesidade foi maior em rapazes do que em raparigas (6,9,10). Esta evidência parece indicar que a tendência sobre o sexo mudou, já que no passado os rapazes eram mais pesados, contudo, parece que agora precisamos de prestar mais atenção às raparigas. Não era o objetivo do presente trabalho avaliar estas variáveis explicativas, portanto e por esse motivo, serão necessários futuros estudos para esclarecer os comportamentos que podem estar a levar a esta condição. Pelo que sabemos, o presente estudo é o primeiro a avaliar exclusivamente dados antropométricos em crianças com idades compreendidas entre os 3 e 9 anos. Estes resultados enfatizam a importância de programas de educação nutricional, mesmo em crianças de curta idade, de forma a melhorar as suas escolhas alimentares e, consequentemente, reduzir as taxas de obesidade infantil. Estudos de acompanhamento em crianças e

adulthood is twofold in obese children compared to the non-obese (10).

Conclusion

Girls showed a significantly higher prevalence of overweight and obesity than boys at age 4 and 9. Individuals over 5 years old showed a higher risk of being overweight or obese at each age category. Similar results were observed for boys and girls separately. Being a girl or being in later childhood was related to presenting $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$.

Acknowledgements

The authors acknowledge all the collaborators and participants involved in the study.

Conflict of interest

All of the authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as representing a potential conflict of interest.

adolescentes mostram que a probabilidade de apresentar obesidade em adultos é dupla em crianças obesas em comparação com as não obesas (10). É importante ressaltar de que durante a infância, o excesso de peso não está associado a maiores taxas de mortalidade a curto prazo, no entanto, aumenta este risco durante a vida adulta.

Conclusão

As meninas apresentaram uma prevalência significativamente maior de sobrepeso e obesidade do que os meninos de 4 e 9 anos. Indivíduos com mais de 5 anos apresentaram maior risco de estar com sobrepeso ou obesidade, em cada categoria de idade. Resultados semelhantes foram observados para meninos e meninas separadamente. Ser criança do sexo feminino e idosos estavam relacionados a apresentar $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os colaboradores e participantes envolvidos no estudo.

Conflito de Interesses

Todos os autores declaram que não há relacionamento financeiro ou pessoal que possa ser entendido como representando um potencial conflito de interesses.

References/ Referências

1. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic - WHO Technical Report Series. WHO Technical Report Series. 2000.
2. Gurr MI. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (WHO, 1990). *Eur J Clin Nutr.* 1991;45(12):619–61923.
3. Cadenas-Sanchez C, Intemann T, Labayan I, Artero EG, Alvarez-Bueno C, Sanchis-Moysi J, et al. Prevalence of severe/morbid obesity and other weight status and anthropometric reference standards in Spanish preschool children: The PREFIT project. *Pediatr Res.* 2019 Feb 18;
4. World Health Organization. WHO | Childhood overweight and obesity. WHO. World Health Organization; 2017.
5. Mamrot P, Hanć T. The Association of the Executive Functions with Overweight and Obesity Indicators in Children and Adolescents: A Literature Review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019 Dec 1;107:59–68.
6. Valdés-Pizarro J, Royo-Bordonada M. Prevalence of childhood obesity in Spain: National Health Survey 2006-2007. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):154–60.
7. Sánchez-Cruz J-J, Jiménez-Moleón JJ, Fernández-Quesada F, Sánchez MJ. Prevalence of Child and Youth Obesity in Spain in 2012. *Rev Española Cardiol (English Ed.* 2013 May 1;66(5):371–6.
8. Schröder H, Ribas L, Koebnick C, Funtikova A, Gomez SF, Fito M, et al. Prevalence of abdominal obesity in Spanish children and adolescents. do we need waist circumference measurements in pediatric practice? Alemany M, editor. *PLoS One.* 2014 Jan 27;9(1):e87549.
9. Serra Majem L, Peña Quintana L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P. Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000). *Med Clin (Barc).* 2003 Jan;121(19):725–32.
10. Pérez-Rodrigo C, Bartrina JA, Majem LS, Moreno B, Rubio AD. Epidemiology of obesity in Spain. Dietary guidelines and strategies for prevention. In: *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 2006. p. 163–71.
11. del Río NG, González-González CS, Martín-González R, Navarro-Adelantado V, Toledo-Delgado P, García-Peñalvo F. Effects of a Gamified Educational Program in the Nutrition of Children with Obesity. *J Med Syst.* 2019 Jul 22;43(7):198.
12. Luppino FS, De Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BWJH, et al. Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. Vol. 67, *Archives of General Psychiatry.* American Medical Association; 2010. p. 220–9.
13. Bhadoria A, Sahoo K, Sahoo B, Choudhury A, Sufi N, Kumar R. Childhood obesity: Causes and consequences. *J Fam Med Prim Care.* 2015;4(2):187.
14. Wijnhoven TM, Van Raaij JM, Spinelli A, Starc G, Hassapidou M, Spiroski I, et al. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative: Body mass index and level of overweight among 6-9-year-old children from school year 2007/2008 to school year 2009/2010. *BMC Public Health.* 2014 Dec 7;14(1):806.
15. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000;320.
16. Madden A.M., Tsikoura T., Stott D.J. The estimation of body height from ulna length in healthy adults from different ethnic groups. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2012; 25, 121–128.

Anthropometric evaluation of pre-school and school age children from Azores archipelago, Portugal

Avaliação antropométrica de crianças com idade pré-escolar e escolar do arquipélago dos Açores, Portugal

Cíntia Ferreira-Pêgo¹, Ana Carrapa², Sara Gaipo³, Tânia Parece³, Raquel Marinho³, Tiago Dias³, Frederico Viveiros⁴, Rita Carvalho⁵, Rui César⁵, Nelson Tavares¹

¹*CBIOS Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal.*

²*Unidade de Saúde da Ilha Terceira, Angra do Heroísmo, Açores*

³*Unidade de Saúde da Ilha de S. Miguel, S. Miguel, Açores*

⁴*Unidade de Saúde da Ilha do Faial, Açores*

⁵*Serviço de Endocrinologia e Nutrição, Hospital do Divino Espírito Santo, S. Miguel, Açores*

Email: nelson.tavares@ulusofona.pt

Abstract

Childhood obesity is associated with immediate adverse consequences, such as lower self-esteem and lower educational attainment, and a higher risk for many harmful comorbidities later in life, such as type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, non-alcoholic fatty liver disease, hypertension, and coronary heart disease.

A cross-sectional analysis to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obesity in pre-school and school children from Azores archipelago was designed. The final sample size included 1069 participants (546 boys and 523 girls) aged between 3.00 and 9.99 years old.

Significant differences were found when the analysis was performed considering overweight and obese as the same category, demonstrating that girls were heavier than boys. Also, girls presented higher BMI than boys specifically at age 6, 7, and 9 years old. The odds ratio of presenting overweight or obese were significantly higher for girls and participants with 4, 6, and 9 years old. Finally, children from the island of Faial demonstrated a lower prevalence of overweight and/or obesity when considering the island of São Miguel as a reference. Our results reveal a high prevalence of obesity mainly among female participants, heightening the need for interventions at early ages, mainly in this population, to effectively control childhood obesity in Portugal.

Keywords: obesity, overweight, children, Azores, Portugal

Resumo

A obesidade infantil está associada a consequências adversas imediatas, como menor autoestima e menor nível educacional, assim como maior risco de comorbidades na idade adulta.

Foi levado a cabo uma análise transversal para avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade em crianças em idade pré-escolar e escolar do arquipélago dos Açores. A amostra incluiu 1069 participantes (546 rapazes e 523 raparigas) com idades entre 3,00 e 9,99 anos.

Quando a análise foi realizada considerando o excesso de peso e obesidade na mesma categoria, foram encontradas diferenças significativas, demonstrando que as raparigas eram mais pesadas que os rapazes. Além disso, as meninas apresentaram maior IMC do que os meninos aos 6, 7 e 9 anos. O Odds Ratio de apresentar excesso de peso ou obesidade foi significativamente maior para raparigas e participantes com 4, 6 e 9 anos. Por fim, crianças da ilha do Faial apresentaram uma menor prevalência de excesso de peso e/ou obesidade, tendo em consideração a ilha de São Miguel como referência. Os nossos resultados revelam uma alta prevalência de excesso de peso e/ou obesidade principalmente entre participantes do sexo feminino, aumentando a necessidade de intervenções em idades precoces, para controlar efetivamente a obesidade infantil em Portugal.

Palavras-chave: obesidade, excesso de peso, crianças, Açores, Portugal

Introduction

Obese children are more likely to become obese adults and to develop significant health consequences at younger ages (1,2). Childhood obesity is associated with immediate adverse consequences, such as psychological problems and lower educational attainment, and a higher risk for many harmful comorbidities later in life, such as type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, non-alcoholic fatty liver disease, hypertension, and coronary heart disease (3–7).

Adipose tissue is considered a complex and highly active metabolic endocrine organ (8), producing various cytokines (9) involved in the regulation of energy metabolism, inflammation, diabetes and atherosclerosis (10–12). Increased levels of adipokines and proinflammatory cytokines have prominent roles in the pathogenesis of the metabolic syndrome (9).

For all these reasons, obesity is a growing health concern that has become an epidemic in modern-day society (13). In particular, childhood obesity has increased dramatically in the past decades (14,15), and if this trend is not reversed, the number of overweight or obese infants and young children worldwide is predicted to double in less than a decade (16).

Prior research suggests that the Portuguese trend of childhood obesity prevalence is plateauing, following the overall pattern for developed countries (17–19). Nevertheless, a recent article from 2018 shows rising trends in overweight (including obesity) in children from 4 through 10 years of age, contrary to these others reports (20). It is important to note that Portugal remains among the top six European countries with the highest prevalence of childhood obesity, with 31.6% overweight (including obese) children aged 7–8 years (17). Additionally, the archipelago of the Azores is the area of Portugal with the highest levels of obesity showing 35.9% (30) which could bring innumerable health consequences to several generations.

Considering all of these reasons, the main objective of the present analyses was to evaluate the anthropometric data from children aged between 3 and 9 years old from Azorean archipelago and the prevalence of normal weight, overweight, and obese- of the same sample.

Introdução

Crianças obesas têm maior probabilidade de se tornarem adultos obesos, assim como de desenvolver consequências significativas para a saúde em idades mais jovens (1,2). A obesidade infantil está associada a efeitos adversos imediatos, como problemas psicológicos e menor nível educacional, além de um risco maior de muitas comorbidades nocivas durante a idade adulta, como Diabetes Mellitus Tipo 2, dislipidemia, doença hepática não alcoólica, hipertensão e doenças coronárias (3-7).

O tecido adiposo é uma fonte bem conhecida de inflamação e considerado um órgão endócrino metabólico complexo e altamente ativo (8). Produz várias citocinas (9) que estão envolvidas na regulação do metabolismo energético, inflamação, diabetes e aterosclerose (10–12). Os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias têm um papel proeminente na patogênese da síndrome metabólica (9).

Por todas essas razões, a obesidade é uma preocupação crescente de saúde e que se tornou uma epidemia na sociedade moderna (13). Em particular, a obesidade infantil aumentou drasticamente nas últimas décadas (14,15) e, se essa tendência não for revertida, prevê-se que o número mundial de bebês e crianças com excesso de peso ou obesidade duplique em menos duma década (16).

Pesquisas anteriores sugeriram que a tendência portuguesa da prevalência da obesidade infantil estabilizou, seguindo o padrão geral para os países desenvolvidos (17–19). No entanto, um artigo recentemente publicado em 2018, mostra tendências crescentes de excesso de peso (incluindo obesidade) em crianças dos 4 aos 10 anos de idade, contrariando esses anteriores relatórios (20). É importante ressaltar que Portugal permanece entre os seis principais países europeus com maior prevalência de obesidade infantil, com 31,6% das crianças com 7 a 8 anos de idade apresentando excesso de peso (incluindo obesidade) (17). É importante também ressaltar que o arquipélago dos Açores é a área de Portugal com os níveis de obesidade mais altos (21), (30) um número chocante que poderá trazer inúmeras consequências para a saúde de várias gerações.

Tendo em consideração todos os motivos descrito anteriormente, o principal objetivo da presente análise foi avaliar os dados antropométricos de crianças entre os 3 e os 9 anos de idade do arquipélago dos Açores e posteriormente avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade da mesma amostra.

Material and Methods

Design and study population

The present study is a cross-sectional analysis designed to assess the prevalence of normal weight, overweight, and obese in children aged between 3.00 and 9.99 years old. The participants were recruited from public schools from São Miguel, Faial and Terceira Islands, all of them included in the Azores archipelago. The children's inclusion criteria involved parental consent (following the Declaration of Helsinki) (29), having no apparent illness, and to be present on the scheduled visit day. The evaluations took place during the 2018/2019 school year. The effective sample size of the present work was 1069 participants.

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. Height was assessed with the children standing upright, with their backs to the stadiometer and with their feet and knees together, their head positioned so that the gaze remained horizontal, according to the Frankfurt plane. The value was recorded to the nearest millimeter (0.1 cm). All the participants wore light clothing and no shoes during the measurements. Body Mass Index (BMI) was calculated from the measurements obtained in each child using the normalized formula [Weight (in kg)/ Height² (in m)] (19). Normal weight, overweight and obese were classified using the international age and gender cut-off points according to those proposed by the International Obesity Task Force (IOTF) (22).

Statistical analysis

Data are presented either as means and standard deviation (SD) for continuous variables or numbers and percentages for dichotomous variables. We compared the distribution of the selected characteristics between groups using Pearson 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 BMI corresponding to overweight and/or obesity cutoff (dependent variable) and gender (two categories), age (years), age categories (seven categories) or island (three categories) as exposure. The models were adjusted for gender, age and island, ex-

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo é uma análise transversal desenvolvido para avaliar a prevalência de peso normal, excesso de peso e obesidade em crianças com idade entre os 3,00 e os 9,99 anos de idade. Os participantes foram recrutados aleatoriamente em escolas públicas das ilhas de São Miguel, Faial e Terceira, todas incluídas no arquipélago dos Açores. Os critérios de inclusão das crianças envolveram o consentimento por escrito dos encarregados de educação (de acordo com a Declaração de Helsínquia) (29), não apresentar doença aparente e estar presente no dia agendado para a visita. As avaliações ocorreram durante o ano letivo de 2018/2019. O tamanho efetivo da amostra do presente trabalho foi de 1069 participantes.

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 altura 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 olhar permanecesse horizontal, de acordo com o plano de Frankfurt. 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)/Altura² (em m)] (19). Peso normal, excesso de peso 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) (22).

Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou números (n) 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 excesso de peso e/ou obesidade (variável dependente) e sexo (duas categorias), idade (anos), categorias de idade (sete categorias) ou ilha (três categorias) como exposição. Os modelos foram ajustados para sexo, idade

cept 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 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

A total of 546 boys and 523 girls (1069 participants) from Azores archipelago with a mean age of 5.62 years (SD:1.87) took part in the present analysis. Children from S. Miguel Island are 803, from Terceira Island 184 and 82 from Faial Island. The general characteristics of the studied population according to gender are summarized in Table 1. No statistical differences were found regarding age, height, weight, and BMI in the studied population.

Table 2 shows the anthropometric measurements for each age categories assessed, separated by gender. Boys had a significantly higher average height than the girls at ages 4 and 5. No other differences were observed in additional parameters, i.e., weight, BMI, or different age categories.

Median BMI for each age category is shown in Figure

e ilha, exceto quando qualquer dessas variáveis fosse 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 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

Participaram na presente análise 546 rapazes e 523 raparigas (1069 participantes) do arquipélago dos Açores, com uma idade média de 5,62 anos (DP: 1,87). As características gerais da amostra de acordo com o sexo estão resumidas na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatísticas na população estudada em relação à idade, altura, peso e IMC.

A tabela 2 mostra as medidas antropométricas para cada faixa etária, separadas por sexo. Os rapazes apresentaram uma estatura média significativamente mais elevada que as raparigas aos 4 e 5 anos de idade. Não foram observadas mais diferenças em relação a outros parâmetros adicionais, como peso ou IMC, nem noutras categorias de idade.

A média de IMC para cada categoria de idade pode ser

Table 1/ Tabela 1 - General characteristics of the study population categorized by gender./ Características gerais da população estudada categorizada por sexo.

	All population/ População total (n=1069)	Boys/ Rapazes (n=546)	Girls/ Raparigas (n=523)	p- value/ valor es-p ^a
Age/ Idade, years/ anos	5.62 (1.87)	5.53 (1.85)	5.71 (1.89)	0.122
Height/ Altura, m	1.13 (0.13)	1.13 (0.13)	1.13 (0.13)	0.984
Weight/ Peso, kg	22.75 (8.16)	22.66 (8.04)	22.84 (8.28)	0.711
BMI/ IMC, kg/m ²	17.22 (3.06)	17.18 (3.08)	17.28 (3.05)	0.611
Age categories/ Categorias de idade, % (n)				
3 years/ anos	13.10 (140)	14.30 (78)	11.90 (62)	
4 years/ anos	20.90 (223)	20.70 (113)	21.00 (110)	
5 years/ anos	20.60 (220)	21.20 (116)	19.90 (104)	
6 years/ anos	10.80 (115)	11.50 (63)	9.90 (52)	0.641
7 years/ anos	15.10 (161)	13.90 (76)	16.30 (85)	
8 years/ anos	10.30 (110)	9.90 (54)	10.70 (56)	
9 years/ anos	9.40 (100)	8.40 (46)	10.30 (54)	

Data expressed as means (SD) or percentages (n), as appropriate. Abbreviations: BMI, body mass index. a p-values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson χ^2 as appropriate. / Dados expressos em média (DP) ou percentagens (n). Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal. a valores-p para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student ou Pearson χ^2 como apropriado.

Table 2/ Tabela 2 - Anthropometric measurements according to gender and age categories./ Tabela 2. Dados antropométricos de acordo com o sexo e categorias de idade.

	All population/ População total	Boys/ Rapazes	Girls/ Raparigas	p-value/ valores-p ^a
3 years/ anos	(n= 140)	(n=78)	(n=62)	
Height/ Altura	0.95 (0.05)	0.95 (0.05)	0.95 (0.04)	0.716
Weight/ Peso	15.30 (2.87)	15.41 (3.00)	15.16 (2.71)	0.618
BMI/ IMC	16.92 (2.43)	17.01 (2.62)	16.81 (2.17)	0.642
4 years/ anos	(n=223)	(n=113)	(n=110)	
Height/ Altura	1.03 (0.05)	1.04 (0.53)	1.02 (0.05)	0.005
Weight/ Peso	18.09 (3.46)	18.44 (3.58)	17.73 (3.31)	0.124
BMI/ IMC	16.94 (2.37)	16.94 (2.27)	16.93 (2.48)	0.976
5 years/ anos	(n=220)	(n=116)	(n=104)	
Height/ Altura	1.10 (0.06)	1.12 (0.05)	1.09 (0.06)	0.003
Weight/ Peso	20.25 (4.07)	20.71 (4.44)	19.74 (3.57)	0.074
BMI/ IMC	16.52 (2.51)	16.58 (2.78)	16.45 (2.18)	0.717
6 years/ anos	(n=115)	(n=63)	(n=52)	
Height/ Altura	1.17 (0.06)	1.18 (0.07)	1.16 (0.05)	0.169
Weight/ Peso	23.69 (5.66)	23.92 (5.74)	23.42 (5.60)	0.637
BMI/ IMC	17.21 (2.99)	17.14 (2.81)	17.30 (3.23)	0.773
7 years/ anos	(n=161)	(n=76)	(n=85)	
Height/ Altura	1.23 (0.06)	1.23 (0.07)	1.23 (0.06)	0.857
Weight/ Peso	25.99 (6.23)	25.87 (6.26)	26.09 (6.23)	0.830
BMI/ IMC	17.08 (2.97)	16.98 (2.88)	17.17 (3.06)	0.680
8 years/ anos	(n=110)	(n=54)	(n=56)	
Height/ Altura	1.28 (0.06)	1.28 (0.06)	1.28 (0.06)	0.589
Weight/ Peso	28.93 (7.00)	29.24 (7.67)	28.62 (6.35)	0.643
BMI/ IMC	17.50 (3.32)	17.56 (3.49)	17.45 (3.17)	0.863
9 years/ anos	(n=100)	(n=46)	(n=54)	
Height/ Altura	1.34 (0.07)	1.34 (0.07)	1.34 (0.07)	0.965
Weight/ Peso	35.94 (10.55)	35.41 (11.06)	36.40 (10.18)	0.644
BMI/ IMC	19.80 (4.64)	19.52 (4.97)	20.04 (4.37)	0.577

Data expressed as means (SD). Height expressed in meters (m), weight in kilograms (kg) and BMI in kg/m². Abbreviations: BMI, body mass index. ^a p-values for comparisons between groups were tested by Student's t-test./ Dados expressos como media (DP). Altura expressa em metros (m), peso em quilogramas (kg) e IMC em kg/m². Abreviatu-
ras: IMC, Índice de Massa Corporal. ^a valores-p para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student.

1. Girls presented higher BMI than boys at ages 6, 7 and 9 years old. At 4 and 8 years old, both girls and boys presented BMI values very similar to each other.

The prevalence of (being) overweight and obese in female children was higher in all age categories (non-significant) (except for ages 7 and 8) than male children (Table 3). Statistically significant differences ($p=0.034$) were found in the total population (not split by age categories) considering overweight and obese as the same category (overweight and/or obese vs. normal weight individuals), girls 35.00% and boys 28.90% (data not shown).

The odds ratios of presenting BMI higher than IOTF overweight cutoff for children (Table 4) were significantly higher for girls and participants with 4, 6 and 9 years old in the fully-adjusted model. When the comparison was performed by gender, it was found that boys aged 6 and boys and girls aged 9 years presented a higher risk of being overweight and/or obese. In the same line of research, the odds ratio analyses by island was also performed. Children from the island of Faial presented a lower prevalence for overweight and/or obese, considering São Miguel Island as a reference. No additional significant results were observed for the other island or when the analyses were performed split by gender.

encontrada na Figura 1. As raparigas apresentaram IMC superior aos rapazes aos 6, 7 e 9 anos de idade. Tanto as raparigas como os rapazes com 4 e 8 anos de idade, apresentaram valores de IMC muito semelhantes entre si.

As crianças do sexo feminino apresentaram (diferenças não significativas), em todas as categorias de idade, maior prevalência de excesso de peso e obesidade (exceto para os 7 e 8 anos) que as crianças do sexo masculino (Tabela 3). Foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,034$) em relação à população total (não subdividida por categorias de idade) quando a análise foi realizada considerando o excesso de peso e a obesidade na mesma categoria (indivíduos com sobrepeso e/ou obesidade vs. peso normal), apresentando as raparigas 35,00% e os rapazes 28,90% (dados não mostrados).

A Odds Ratio de apresentar IMC superior ao ponto de corte recomendado pela IOTF para excesso de peso (Tabela 4) foi significativamente maior para as raparigas e participantes com 4, 6 e 9 anos, no modelo mais ajustado. Quando a comparação foi realizada por sexo, verificou-se que os rapazes de 6 anos, assim como os meninos e meninas de 9 apresentaram maior risco de estar acima do peso recomendado. Na mesma linha de pesquisa, também foram realizadas as análises de Odds Ratio por ilha. As crianças da ilha do Faial apresentaram menor prevalência de excesso de peso e/ou obesidade, tendo em consideração a ilha de São Miguel como referência. Não foram observados outros resultados significativos adicionais.

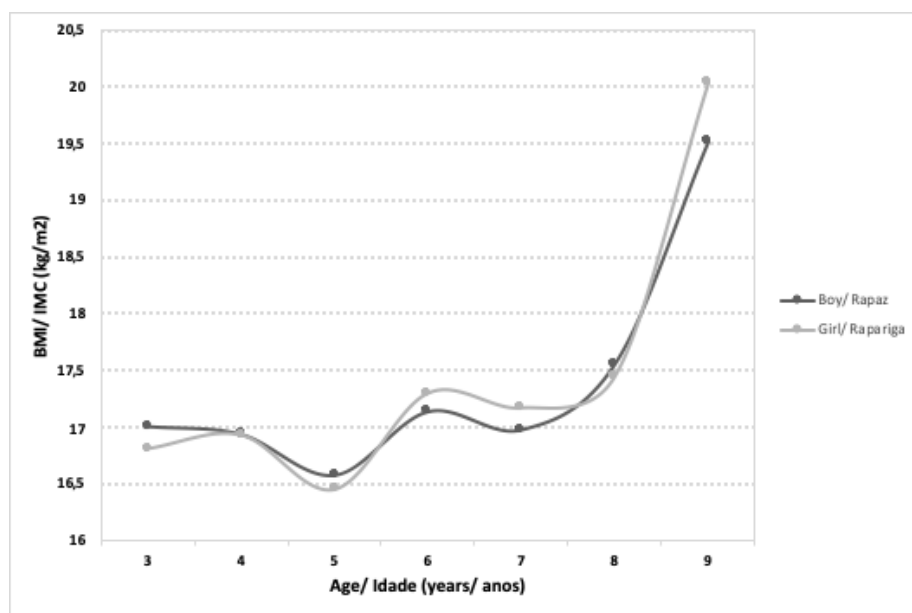


Figure 1/ Figura 1 - Median BMI values for each age categories by gender./ Valores médios de IMC para cada categoria de idade por sexo.

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

	All population/ População total	Boys/ Rapazes	Girls/ Raparigas	p-value/ valores-p ^a
3 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	76.40 (107)	79.50 (62)	72.60 (45)	
Overweight/ Excesso de peso	14.30 (20)	12.80 (10)	16.10 (10)	0.618
Obesity/ Obesidade	9.30 (13)	7.70 (6)	11.30 (7)	
4 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	66.80 (149)	67.30 (76)	66.40 (73)	
Overweight/ Excesso de peso	18.80 (42)	18.60 (21)	19.10 (21)	0.990
Obesity/ Obesidade	14.30 (32)	14.20 (16)	14.50 (16)	
5 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	73.60 (162)	77.60 (90)	69.20 (72)	
Overweight/ Excesso de peso	13.60 (30)	10.30 (12)	17.30 (18)	0.279
Obesity/ Obesidade	12.70 (28)	12.10 (14)	13.50 (14)	
6 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	60.00 (69)	63.50 (40)	55.80 (29)	
Overweight/ Excesso de peso	19.10 (22)	15.90 (10)	23.10 (12)	0.589
Obesity/ Obesidade	10.90 (24)	20.60 (13)	21.20 (11)	
7 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	70.80 (114)	73.70 (56)	68.20 (58)	
Overweight/ Excesso de peso	19.90 (32)	14.50 (11)	24.70 (21)	0.195
Obesity/ Obesidade	9.30 (15)	11.80 (9)	7.10 (6)	
8 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	67.30 (74)	68.50 (37)	66.10 (37)	
Overweight/ Excesso de peso	16.40 (18)	14.80 (8)	17.90 (10)	0.911
Obesity/ Obesidade	16.40 (18)	16.70 (9)	16.10 (9)	
9 years/ anos				
Normal Weight/ Peso normal	53.00 (53)	58.70 (27)	48.10 (26)	
Overweight/ Excesso de peso	22.00 (22)	21.70 (10)	22.20 (12)	0.465
Obesity/ Obesidade	25.00 (25)	19.60 (9)	29.60 (16)	
TOTAL				
Normal Weight/ Peso normal	68.10 (728)	71.10 (388)	65.00 (340)	
Overweight/ Excesso de peso	17.40 (186)	15.00 (82)	19.90 (104)	0.070
Obesity/ Obesidade	14.50 (155)	13.90 (76)	15.10 (79)	

Data expressed as percentages (n). ^a p-values for comparisons between groups were tested by Pearson χ^2 . Normal weight, overweight or obesity were categorized according to IOTF criteria (22). / Dados expressos como percentagem (n). ^a valores-p para comparações entre grupos foram testados mediante Pearson χ^2 . Peso normal, excesso de peso e obesidade foram categorizados de acordo com os critérios da IOTF (22).

Table 4/ Tabela 4 - Association (odds ratio) between presenting overweight and/or obesity (BMI) > 25 kg/m² and gender or age categories./ Associação (odds ratio) entre apesr entrar excesso de peso e/ou obesidade IMC > 25 kg/m² e sexo ou categorias de idade.

Variables/ Variáveis	All population/ População total (n=1069)	Boys/ Rapazes (n=546)	Girls/ Raparigas (n=523)
Gender/ Sexo ^a	1.32 (1.01-1.72)	-	-
Age categories/ Categorias de idade			
3 years/ anos	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
4 years/ anos	1.66 (1.01-2.73)	1.95 (0.97-3.91)	1.41 (0.69-2.90)
5 years/ anos	1.16 (0.71-1.91)	1.13 (0.56-2.28)	1.19 (0.58-2.44)
6 years/ anos	2.25 (1.30-3.88)	2.31 (1.08-4.94)	2.18 (0.99-4.81)
7 years/ anos	1.37 (0.81-2.31)	1.50 (0.70-3.21)	1.25 (0.60-2.58)
8 years/ anos	1.60 (0.91-2.81)	1.86 (0.84-4.16)	1.38 (0.63-3.05)
9 years/ anos	2.90 (1.66-5.08)	2.90 (1.29-6.55)	2.86 (1.31-6.23)
Island/ Ilha			
São Miguel	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Faial	0.50 (0.29-0.88)	0.49 (0.22-1.09)	0.52 (0.24-1.11)
Terceira	0.89 (0.59-1.33)	0.93 (0.51-1.71)	0.85 (0.49-1.48)

Data expressed as ORs (95% Confidence Interval). a Gender was coded as 0 for male and 1 for female. Logistic regression model adjusted for gender, age and island (except when any of these variables were the independent variable)./ Dados expressos em OR (95% intervalo de confiança). ^a Sexo foi codificado como 0 para masculino e 1 para feminino. Modelo de regressão logística ajustada por sexo, idade e ilha (exceto quando algumas dessas variáveis foram analisadas como variáveis independentes).

Discussion

The results of the present study indicate that 31.90% of the total population presented overweight, 14.50% of these being obese. The WHO European COSI reports suggested that childhood obesity in Portugal is slightly decreasing, with a drop from 15.30% (2008) to 13.90% (2013), without major sex differences (17,18). In our sample, the estimated prevalence of obesity was higher when compared to the last results of the WHO European COSI surveys (14.50% vs. 13.90%), suggesting that Portuguese children remain among the most overweight and obese across Europe. Specifically, some of the highest levels of obesity in the world are found in island populations (23–27), as the case of Azores. These results can be explained by a range of factors, including low levels of physical activity and a decrease in the consumption of the traditional foods of the islands, such as fresh fish, meat, and local fruits and vegetables, which have been replaced with a high-energy-dense

Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que 31,90% da população total apresentou excesso de peso, sendo 14,50% obesos. Os relatórios europeus do *Child Obesity Surveillance Initiative* (COSI)/Organização Mundial da Saúde (OMS) Europa sugeriram que a obesidade infantil em Portugal está a diminuir levemente, com uma queda de 15,30% (em 2008) para 13,90% (em 2013), sem grandes diferenças em relação a sexo (17,18). Na nossa amostra, a prevalência estimada de obesidade foi maior quando comparada com os últimos resultados das pesquisas europeias COSI/OMS (14,50% vs. 13,90%), sugerindo que as crianças portuguesas permanecem entre as que apresentam maiores níveis de excesso de peso e obesidade de toda a Europa. Especificamente, alguns dos níveis mais elevados de obesidade no mundo são encontrados em populações insulares (23-27), como é o caso dos Açores. Esses resultados podem ser explicados por uma série de fatores, incluindo baixos

diet (27). Data from 6- to 10-year-old children from the nine islands of the archipelago of Azores (28) showed very similar results to those found in our study, as the prevalence of overweight in girls was 36.00% and in boys was 29.90%, which was associated with low levels of physical activity, particularly in girls.

Girls were also significantly more overweight than boys (without age distinction) and presented a higher risk of having higher than recommended BMI levels according to IOTF criteria. The results observed in the present analyses were in line with other previous reports (15,18,19,28), where the authors described that girls showed a higher prevalence of overweight (including obesity) in early/middle childhood.

Regarding the lower prevalence of excess weight and/or obesity found in individuals from Faial Island compared to those from São Miguel, to the best of our knowledge, the present publication is the first one to describe this finding. Further studies are needed to better understand the sociodemographic variables that could explain it.

In Table 4 it was verified that the 4, 6, and 9 year-old individuals were those who presented higher prevalences related to being overweight according IOTF criteria than the children of the remaining age levels. These differences do not follow any chronological order and for this reason, are difficult to explain. However, it was also previously reported in Portugal that at age 4 and 7 girls presented statistically higher BMI values than boys, and at age 10 boys were heavier than girls (21). These results suggest that it is possible that some relation exists between being overweight and age, mainly at 4, 6-7 and 9-10 years old.

Furthermore, we observed that children were more prone to increase their BMI at age 4, 6 and 9 years, indicating that this is the best period to strengthen obesity prevention strategies. It is imperative to highlight the importance of prevention and reinforce the need for effective early age population-based strategies to prevent children from initially becoming overweight.

Conclusion

Girls presented higher BMI values than boys at age 6, 7 and 9 years. Girls also presented higher levels of overweight and obesity than boys, without age differ-

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 (27). Dados de crianças de 6 a 10 anos das nove ilhas do arquipélago dos Açores (28) mostraram resultados muito semelhantes aos encontrados por nós, uma vez que a prevalência de excesso de peso nas meninas foi de 36,00% e nos meninos foi de 29,90%, os quais foram associados a baixos níveis de atividade física, principalmente nas raparigas.

Na presente análise, as raparigas também apresentaram um excesso de peso significativamente maior do que os rapazes (sem distinção de idade) e apresentaram maior risco de apresentar níveis de IMC acima do recomendado. Estes resultados observados foram condizentes com outros relatórios anteriores (15,18,19,28), nos quais os autores descreveram que as raparigas apresentaram maior prevalência de excesso de peso (incluindo obesidade) na primeira infância.

Quanto à menor prevalência de excesso de peso e/ou obesidade que os indivíduos da ilha do Faial apresentaram em comparação com os da ilha de São Miguel, até onde sabemos, a presente publicação é a primeira a descrever este dado. Contudo, mais estudos são necessários para entender melhor as variáveis sociodemográficas que poderiam explicá-lo.

Sobre as faixas etárias, foram encontradas algumas relações estatísticas, principalmente em indivíduos de 4, 6 e 9 anos. Essas diferenças não seguem uma ordem cronológica e, por esse motivo, são difíceis de explicar. No entanto, também foi anteriormente encontrado em Portugal que, aos 4 e 7 anos, as raparigas apresentavam valores estatisticamente mais altos do que os rapazes e, aos 10 anos, os rapazes eram mais pesados que as raparigas (21). Esses resultados sugerem que é possível existir alguma relação entre excesso de peso e idade, principalmente aos 4, 6-7 e 9-10 anos.

Os resultados observados sugerem que as crianças são mais propensas a aumentar o seu IMC aos 4, 6 e 9 anos, o que nos pode indicar de que este é o melhor período para fortalecer as estratégias de prevenção da obesidade. É imperativo destacar a importância da prevenção e reforçar a necessidade de estratégias eficazes dedicadas à população em idade precoce de forma a controlar a prevalência de obesidade infantil.

Conclusão

As raparigas apresentaram valores de IMC mais altos que os rapazes aos 6, 7 e 9 anos. Também, as meninas apresentaram níveis mais altos de excesso de peso

ences. Being female and having 4, 6 (only in boys) and 9 (both for girls and boys, separately) years of age were related with a higher risk of presenting overweight and/or obese. Our results reveal a high prevalence of obesity mainly among female participants, heightening the need for interventions at early ages to effectively control childhood obesity in Portugal.

Acknowledgements

The authors acknowledge all the collaborators and participants involved in the study.

Conflict of Interests

All of the authors declare that no financial or personal relationship can be understood as representing a potential conflict of interest.

e obesidade em comparação com os meninos, sem diferenças de idade. Ser criança do sexo feminino e ter 4, 6 (apenas nos rapazes) e 9 anos de idade (tanto para raparigas quanto para rapazes, separadamente) está relacionado com um maior risco de apresentar excesso de peso e/ou obesidade. Os nossos resultados revelam uma alta prevalência de obesidade principalmente entre participantes do sexo feminino, ressaltando a necessidade de intervenções nutricionais em idades precoces, de forma a controlar efetivamente a obesidade infantil em Portugal.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os colaboradores e participantes envolvidos no estudo.

Conflito de Interesses

Cada um dos autores declara que não existe qualquer relacionamento financeiro ou pessoal que possa ser entendido como representando um potencial conflito de interesse.

References/ Referências

1. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med*. 2010 Feb 11;362(6):485–93.
2. Friedemann C, Heneghan C, Mahtani K, Thompson M, Perera R, Ward AM. Cardiovascular disease risk in healthy children and its association with body mass index: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012 Sep 25;345(7876):e4759–e4759.
3. Spinelli A, Buoncristiano M, Kovacs VA, Yngve A, Spiroski I, Obreja G, et al. Prevalence of severe obesity among primary school children in 21 European countries. *Obes Facts*. 2019;12(2):244–58.
4. Park MH, Falconer C, Viner RM, Kinra S. The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: A systematic review. *Obes Rev*. 2012 Nov;13(11):985–1000.
5. Putnam C. Childhood overweight and obesity: <<http://www.cdc.gov/obesity/childhood>>. *J Consum Health Internet*. 2012;16(1):77–84.
6. Rankin J, Matthews L, Copley S, Han A, Sanders R, Wiltshire HD, et al. Psychological consequences of childhood obesity: psychiatric comorbidity and prevention. *Adolesc Health Med Ther*. 2016 Nov; Volume 7:125–46.
7. Pulgarón ER. Childhood Obesity: A Review of Increased Risk for Physical and Psychological Comorbidities. Vol. 35, *Clinical Therapeutics*. 2013. p. A18–32.
8. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004. p. 2548–56.
9. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: An update. Vol. 64, *Clinical Endocrinology*. 2006. p. 355–65.
10. Gulcelik NE, Usman A, Gürlek A. Role of adipocytokines in predicting the development of diabetes and its late complications. *Endocrine*. 2009 Dec 25;36(3):397–403.
11. Sabbatini AR, Fontana V, Laurent S, Moreno H. An update on the role of adipokines in arterial stiffness and hypertension. Vol. 33, *Journal of Hypertension*. 2015. p. 435–44.
12. Barseghian A, Gawande D, Bajaj M. Adiponectin and vulnerable atherosclerotic plaques. Vol. 57, *Journal of the American College of Cardiology*. 2011. p. 761–70.
13. García-Hermoso A, Ceballos-Ceballos RJM, Poblete-Aro CE, Hackney AC, Mota J, Ramírez-Vélez R. Exercise, adipokines and pediatric obesity: A meta-analysis of randomized controlled trials. Vol. 41, *International Journal of Obesity*. 2017. p. 475–82.
14. De Onis M, Blössner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990–2020. *Public Health Nutr*. 2012 Jan 14;15(1):142–8.
15. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. 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*. 2014 Aug 30;384(9945):766–81.
16. World Health Organization. Facts and figures on childhood obesity. *Comm End Child Obes*. 2014;14–6.
17. Rito A, Graça P. Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2013. 2015.
18. Rito AI, Paixão E, Carvalho MA, Ramos C. Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2010. 2012.
19. Wijnhoven TM, Van Raaij JM, Spinelli A, Starc G, Hassapidou M, Spiroski I, et al. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative: Body mass index and level of overweight among 6–9-year-old children from school year 2007/2008 to school year 2009/2010. *BMC Public Health*. 2014 Aug 7;14(1):806.
20. Rito AI, Buoncristiano M, Spinelli A, Salanave B, Kunešová M, Hejgaard T, et al. Association between characteristics at birth, breastfeeding and obesity in 22 countries: The WHO European childhood obesity surveillance initiative - COSI 2015/2017. *Obes Facts*. 2019;12(2):226–43.
21. Freitas AI, Moreira C, Santos AC. Time trends in prevalence and incidence rates of childhood overweight and obesity in Portugal: Generation XXI birth cohort. *Int J Obes*. 2019 Feb 19;43(2):424–7.
22. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320.
23. Garza JR, Pérez EA, Prelip M, McCarthy WJ, Feldman JM, Canino G, et al. Occurrence and correlates of overweight and obesity among island Puerto Rican youth. *Ethn Dis*. 2011;21(2):163–9.
24. Athanasopoulos DT, Garopoulou AI, Dragoumanos VP. Childhood obesity and associated factors in a rural Greek island. *Rural Remote Health*. 2011;11(4):1641.
25. Schwiebbe L, van Rest J, Verhagen E, Visser RWM, Holthe JK, Hirasings RA. Childhood obesity in the Caribbean. *West Indian Med J*. 2011 Jul;60(4):442–5.
26. Grech V, Farrugia Sant'Angelo V. Body mass index estimation in a school-entry aged cohort in Malta. *Int J Pediatr Obes*. 2009 Jan;4(2):126–8.
27. Curtis M. The Obesity Epidemic in the Pacific Islands. *J Dev Soc Transform*. 2004;1:37–42.
28. Pereira SA, Seabra AT, Silva RG, Katzmarzyk PT, Beunen GP, Maia JA. Prevalence of overweight, obesity and physical activity levels in children from Azores Islands. *Ann Hum Biol*. 2010 Oct 7;37(5):682–91.
29. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research. 2013; 310(20):2191–2192. Doi:10.1001/Jama.2013.281053
30. INSA. Childhood Obesity Surveillance Initiative COSI Portugal 2019. <http://www.insa.min-saude.pt/cosi-portugal-2019-excesso-de-peso-e-obesidade-infantil-continua-em-tendencia-decrescente/>

Body shape concerns in Portuguese university students

Preocupação com a forma física em estudantes universitários Portugueses

Cíntia Ferreira-Pêgo^{1,2}, Adriana Costa², Joana Rodrigues², Bruno Sousa,^{1,2}

¹*CBIOS Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal.*

²*School of Sciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal*
Email: cintia.pego@ulusofona.pt

Abstract

Many current models of beauty in developed countries represent extreme thinness in women and a muscular body in men. The body image perception will condition the search for ideal beauty through different behaviors and can be transformed into eating disorders. The university students, with the changes typical of youth and university transition, are a vulnerable group.

The purpose of this analysis was to evaluate the concerns about body shape in university students from the Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

The study included 163 students, of whom 100 were women, with a mean age of 21.71 (SD=3.80) years. 81% of men presented no body shape concerns, 17.50% showed mild, 1.60% moderate and 0% intense preoccupation. In comparison, 59% of women presented no level of body shape concerns, 27% showed a mild, 10% moderate, and 4% intense body shape preoccupation. The odds ratio of presenting concerns about body shape were significantly related to being of female gender.

There were more cases of preoccupation about body shape in women, regardless of age, academic course, or adherence to the Mediterranean diet.

Keywords: body shape; body shape concerns; body shape perception; university students; Portuguese students.

Resumo

Alguns dos modelos atuais de beleza presentes nos países desenvolvidos representam uma extrema delgadez nas mulheres e um corpo musculado nos homens. A percepção da imagem corporal condicionará a busca pela beleza ideal através de diferentes comportamentos e poderá ser transformada em transtornos do comportamento alimentar. Os estudantes universitários, com as mudanças típicas da transição juvenil e universitária, são um grupo mais vulnerável.

O objetivo desta análise foi de avaliar a preocupação com forma física por parte de estudantes universitários da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

O estudo incluiu 163 estudantes, dos quais 100 eram mulheres, com uma idade média de 21,71 (DP=3.80) anos. 81% dos homens não apresentaram preocupação com a sua forma física, 17,50% apresentaram preocupação leve, 1,60% moderada e 0% intensa. Em comparação, 59% das mulheres não apresentaram preocupação com a sua forma física, contudo, 27% apresentaram preocupação leve, 10% moderada e 4% intensa sobre a sua forma física. A associação entre apresentar preocupação com a sua imagem corporal foi significativamente relacionada com o facto de ser mulher. Houve mais casos de preocupação com forma física em mulheres, independentemente da idade, do curso académico ou da adesão à dieta mediterrânea.

Palavras-chave: forma física; preocupação com forma física; percepção da imagem corporal; estudantes universitários; estudantes Portugueses.

Introduction

Body image was first defined as an individual's thoughts, feelings, and behaviors related to body shape and physical ability (1). The relationship between the body and cognitive processes such as beliefs, values, and individual and/or social attitudes comprises body image perception, that is, an individual's perception of real and desirable body attributes (2).

Different authors have shown that, although presenting under or normal weight, many people perceive themselves as being overweight (3,4). It has been reported that 28% of United States college students having a Body Mass Index (BMI) ≤ 25 were still trying to lose weight (5). Non-overweight individuals may feel pressure on social media to achieve weight-loss goals using weight-loss products and programs.

Women may be more likely than men to be influenced by appearance pressures and experience more body dissatisfaction, this is especially notable due to the emphasis on thinness in women across all age groups, and the overall presentation of the female body as attractive rather than functional (6,7). The cultural construction of the ideal body has various emotional, cognitive, and behavioral consequences (8). The attempt to reach that canon of dominant beauty present in developed countries, leads people to follow diets (in most cases, "miracle" or unsupervised diets), the performance of excessive physical exercise, the use of supplements or steroids, and ultimately can lead to disruption of eating behavior (9).

The university students are more likely to the typical changes of youth, to sociological and cultural changes due to the beginning of university studies (10). Sometimes, these changes involve situational stressors that can alter psychological and somatic functioning (11).

Therefore, taking into consideration all the consequences that body image distortion can bring to individual daily life, the main aim of the present study was to evaluate if university students from the Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias in Lisbon, presented concerns about body shape and their level of preoccupation.

Introdução

A imagem corporal foi primeiramente definida como os pensamentos, sentimentos e comportamentos de um indivíduo relacionados com a forma corporal e a capacidade física (1)(19). A relação entre o corpo e os processos cognitivos, como crenças, valores e atitudes individuais e/ ou sociais, compreende a percepção da imagem corporal, ou seja, a percepção individual dos atributos corporais reais e desejáveis (2). Diferentes autores demonstraram que muitas pessoas apesar de apresentarem um peso normal ou abaixo do recomendado, percebem-se com excesso de peso (3,4). Foi descrito que 28% dos estudantes universitários nos Estados Unidos da América, com um Índice de Massa Corporal (IMC) ≤ 25 , estavam a tentar perder peso (5). Indivíduos que não têm excesso de peso podem sentir pressão para alcançar metas de perda de peso, usando produtos e programas de emagrecimento. As mulheres podem ser mais propensas do que os homens a serem influenciadas por pressões de aparência e a sentir uma maior insatisfação corporal, um exemplo especialmente notável é a ênfase na magreza das mulheres em todas as faixas etárias, e a interpretação de que é mais importante que o corpo feminino seja atraente do que funcional (6,7). A construção cultural do corpo ideal tem várias consequências emocionais, cognitivas e comportamentais (8). A tentativa de alcançar esse cânone de beleza dominante dos países desenvolvidos leva as pessoas a seguirem dietas (na maioria dos casos, "milagrosas" ou dietas não supervisionadas por um profissional, como um Nutricionista), a prática excessiva de exercício físico, o uso de suplementos alimentares que, em última análise, pode levar a transtornos do comportamento alimentar (9). Os universitários são mais propensos às mudanças típicas da juventude, às mudanças sociológicas e culturais devidas ao início dos estudos universitários e ao facto de que a maioria deixa a casa dos pais e passa a viver sozinho, tendo o primeiro contacto com a independência (10). Às vezes, essas mudanças envolvem situações stressantes que podem alterar o funcionamento psicológico e somático (11).

Assim sendo e tendo em consideração todas as consequências que a distorção da imagem corporal pode trazer ao quotidiano individual, o principal objetivo do presente estudo foi o de avaliar se os estudantes universitários da *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias* de Lisboa apresentavam preocupação sobre a sua forma física e qual o seu nível de inquietação.

Materials and Methods

Design and study population

The present study is a cross-sectional analysis designed to assess concern about body shape in university students from nutrition sciences, pharmaceutical sciences, sports, and other courses not related to the health sciences area. The participants were all students, adults (≥ 18 years), and were randomly recruited at *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias* during the school year of 2017/2018. For the present analysis no exclusion criteria was used, in this way our study included students from all ethnics, nationalities and students from all years of their academic course.

The effective sample size for the present study was 163 participants.

Assessment of body shape concerns

Body shape concern was assessed using the validated Body Shape Questionnaire (BSQ) from Cooper and collaborators (12). The BSQ is a 34-item self-report measure of body image dissatisfaction (BID). The questions refer to the subject's state over the past four weeks, and each item is scored from 1 ('never') to 6 ('always'). A total score is obtained by adding the item scores, resulting in a total score range from 14 to 84. Higher scores indicate greater body image concerns. The BSQ has demonstrated good reliability and validity in previous research and has been widely used in studies of BID featuring both non-clinical and clinical populations. In the present analyses, a Portuguese translation of the original questionnaire was used, which was already published and validated. Also, the same authors used this questionnaire to assess body shape concerns in university students of both sexes, presenting a greater internal validity, dimensionality, and performance for this population (13).

Statistical analysis

Data are 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 body shape concerns (dependent variable) and sex (two categories), age (years), academic degree (four categories), or Mediterranean Diet

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo é uma análise transversal destinada a avaliar a presença de preocupação sobre a forma física de estudantes universitários de ciências da nutrição, ciências farmacêuticas, desporto e outros cursos não relacionados com a área de ciências da saúde.

Os participantes eram todos estudantes, adultos (≥ 18 anos) e recrutados aleatoriamente na *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*, durante o ano letivo de 2017/2018. Na presente análise, não foram utilizados critérios de exclusão, desta forma, o nosso estudo incluiu estudantes de todas as etnias, nacionalidades e estudantes de todos os anos dos seus cursos académicos. O tamanho efetivo da amostra para o presente estudo foi de 163 participantes.

Avaliação da preocupação sobre a forma física

A preocupação sobre a forma física foi avaliada através do Questionário Body Shape (QBS) validado por Cooper e colaboradores (11). O QBS é um questionário de autorrelato de 34 itens de insatisfação com a imagem corporal. As perguntas referem-se ao estado do sujeito nas últimas quatro semanas e cada item é pontuado de 1 ("nunca") a 6 ("sempre"). O resultado total é obtido pela soma das pontuações de cada item, resultando numa pontuação final de entre 14 a 84 pontos. Pontuações mais altas indicam maiores preocupações com a imagem corporal.

Na presente análise, foi utilizada a versão traduzida para o Português do questionário original, a qual já foi publicada e validada. Também, os mesmos autores utilizaram esse questionário para avaliar preocupações com a forma corporal em universitários de ambos os sexos, apresentando uma grande validade interna, dimensionalidade e desempenho para essa mesma população (12).

Análise estatística

Os dados são 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 χ^2 para variáveis categóricas ou testes t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado, para variáveis contínuas. Foram efetuados modelos de regressão logística para a avaliação da associação entre apresentar preocupação sobre a forma corporal (variável dependente) e variáveis de exposição como o sexo (duas categorias), idade (anos),

(MedDiet) adherence (0 to 14 score) as exposure. The models were adjusted for sex, age, academic course, and MedDiet adherence, 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 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

A total of 163 students from the *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias* (63 men and 100 women) took part in the present analyses with a mean age of 21.71 (SD=3.80) years. The general characteristics of the studied population according to academic courses are summarized in **Table 1**. Nutritional sciences students presented significantly higher adherence to the MedDiet compared to the rest of the academic courses. No differences between studies were observed regarding age and sex distribution.

Differences between body shape concern levels and sociodemographic characteristics are presented in **Table 2**. In the current analysis, presenting a preoccupation of body shape in all levels of concern was related to sex. 81% of men presented no body shape concern, 17.50% showed mild, 1.60% moderate, and 0% intense concern. In comparison, 59% of women presented no level of body shape concern, 27% showed a mild, 10% moderate and 4% intense body shape preoccupation. No significant differences were observed regarding MedDiet adherence, age, or academic course.

The odds ratio of presenting concern about body shape (**Table 3**) were significantly related to being women in the fully adjusted model. No significant differences were observed regarding age, MedDiet adherence, or between different academic courses when other students not related to health sciences field were considered as the reference. However, when nutrition sciences students were considered as the reference, pharmaceutical students presented a higher risk [4.37(1.04-18.45)] of presenting body shape concern (data not shown).

curso acadêmico (quatro categorias) ou adesão à dieta mediterrânea (DM) (0 a 14 pontos). Os modelos de regressão logística foram ajustados por sexo, idade, curso acadêmico e adesão à DM, exceto quando qualquer destas variáveis foi considerada como 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 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

Participaram no presente estudo, um total de 163 estudantes da *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias* (63 homens e 100 mulheres) com uma idade média de 21,71 (DP=3.80) anos. As características gerais da população estudada de acordo com os cursos acadêmicos estão resumidas na **Tabela 1**. Os estudantes da licenciatura em Ciências da Nutrição apresentaram uma adesão à DM significativamente maior em comparação com os estudantes dos restantes cursos. Não foram observadas diferenças entre os estudos acadêmicos quanto à distribuição por idade e sexo.

As diferenças entre os níveis de preocupação com a forma física e as características sociodemográficas estão representadas na **Tabela 2**. Na análise atual, a apresentação de preocupação sobre a imagem corporal em todos os seus níveis foi relacionada com o sexo dos participantes. 81% dos homens não apresentaram preocupação sobre a sua imagem corporal, 17,50% apresentaram preocupação leve, 1,60% moderada e 0% intensa. Contrariamente, 59% das mulheres não apresentaram preocupação sobre a sua forma física, 27% apresentaram preocupação leve, 10% moderada e 4% intensa. Não foram observadas diferenças significativas em relação à adesão à DM, idade ou curso académico.

A probabilidade de apresentar inquietação sobre a sua imagem corporal (**Tabela 3**) foi significativamente maior no sexo feminino, no modelo totalmente ajustado. Não foram observadas relações significativas com a idade, adesão à DM nem entre diferentes cursos académicos, quando os estudantes de licenciaturas não relacionadas com ciências da saúde foram considerados como referência.

No entanto, quando os estudantes da licenciatura de ciências da nutrição foram considerados como referência, os alunos do mestrado integrado em ciências farmacêuticas apresentaram uma associação estatisticamente significativa [4,37 (1,04-18,45)] de sofrer de preocupação sobre a sua imagem corporal (dados não mostrados).

Table 1/ Tabela 1 - General characteristics of the study population categorized by academic degree/ Características gerais da população estudada categorizada por curso acadêmico

	All population/ População tot (n=163)	Nutrition/ Nutrição (n=24)	Pharmacy/ Farmácia (n=18)	Sports/ Desporto (n=26)	Others/ Outros (n=95)	p-value ^a
Men/ Homem, % (n)	38.70 (63)	6.30 (4)	14.30 (9)	20.60 (13)	58.70 (37)	0.063
Women/ Mulher, % (n)	61.30 (100)	20.00 (20)	9.00 (9)	13.00 (13)	58.00 (58)	
Age, years/ Idade, anos	21.71 (3.80)	21.71 (2.79)	21.94 (3.30)	22.00 (3.64)	21.59 (4.17)	0.958
MedDiet adherence*/ Adesão à DM*	6.79 (2.28)	8.05 (2.26)	7.17 (1.65)	6.88 (1.90)	6.38 (2.38)	0.016

Data expressed as means (SD) or percentages (n). ^ap values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson χ^2 as appropriate. *Mediterranean diet (MedDiet) adherence expressed in points (score: 0 – 14 points)./ Dados expressos em média (DP) ou percentagens (n). ^aValores p para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student ou Pearson χ^2 como apropriado. *Adesão à dieta Mediterrânea (DM) expressa em pontos (resultado: 0 a 14 pontos).

Table 2/ Tabela 2 - Differences between levels of preoccupation regarding body shape and sociodemographic characteristics/ Diferenças entre níveis de preocupação sobre forma física e características sociodemográficas.

	Absence/ Ausência (n=110)	Mild/ Leve (n=38)	Moderate/ Moderado (n=11)	Intense/ Intenso (n=4)	p-value ^a
Academic degree/ Curso acadêmico, % (n)					
Nutrition/ Nutrição	79.20 (19)	8.39 (2)	12.50 (3)	0.00 (0)	0.326
Pharmacy/ Farmácia	55.60 (10)	38.90 (7)	5.60 (1)	0.00 (0)	
Sports/ Desporto	76.90 (20)	19.20 (5)	3.80 (1)	0.00 (0)	
Others/ Outros	64.20 (61)	25.30 (24)	6.30 (6)	4.20 (4)	
Sex/ Sexo, % (n)					
Men/ Homem	81.00 (51)	17.50 (11)	1.60 (1)	0.00 (0)	0.013
Women/ Mulher	59.00 (59)	27.00 (27)	10.00 (10)	4.00 (4)	
MedDiet adherence/ adesão à DM	6.68 (2.35)	7.22 (1.93)	6.64 (2.66)	6.25 (2.50)	0.611
Age/ Idade, years/ anos	21.70 (4.25)	21.68 (2.53)	22.36 (3.04)	20.50 (3.11)	0.867

Data expressed as mean (SD) and percentages (n). ^ap values for comparisons between groups were tested by Student's t-test or Pearson χ^2 as appropriate. *Mediterranean diet (MedDiet) adherence expressed in points (score: 0 – 14 points)./ Dados expressos em média (DP) ou percentagens (n). ^aValores p para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student ou Pearson χ^2 como apropriado. * Adesão à dieta Mediterrânea (DM) expressa em pontos (resultado: 0 a 14 pontos).

Table 3/ Tabela 3 - Association (Odds Ratio) between presenting preoccupation about body shape according sex, age, Mediterranean diet adherence and academic degree/ Associação (odds ratio) entre apresentar preocupação sobre forma física de acordo com sexo, idade, adesão à dieta Mediterrânea e curso acadêmico.

Variables/ Variáveis	All population/ População total (n=163)
Sex / Sexo ^a	0.27 (0.12-0.62)
Age/ Idade	1.02 (0.93-1.12)
MedDiet adherence/ Adesão à DM	1.03 (0.88-1.22)
Academic degree/ Curso acadêmico	
Nutrition/ Nutrição	0.38 (0.12-1.18)
Pharmacy/ Farmácia	1.67 (0.56-5.01)
Sports/ Desporto	0.57 (0.20-1.65)
Others/ Outros	1.00 (ref.)

Data expressed as OR (95% Confidence Interval). ^a Sex was coded as 1 for men and 0 for women. Logistic regression model was adjusted for sex, age, academic degree and Mediterranean diet (MedDiet) adherence (except when any of these variables were considered as the independent variable). / Dados expressos em OR (95% intervalo de confiança). ^aSexo foi codificado como 1 para homem e 0 para mulher. Modelo de regressão logística ajustada por sexo, idade, curso acadêmico e adesão à Dieta Mediterrânea (DM) (exceto quando qualquer dessas variáveis foram consideradas como variáveis independentes).

Discussion

To the best of our knowledge, the present study is the first one to identify the presence of body shape concern in Portuguese university students. These results indicate that women were more likely to show some concerns about their body shape, mainly severe preoccupation. No relation between presenting body shape concern and MedDiet, age, and academic course was found in Portuguese students from the *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*. The practical implications of these findings are significant because negative body image relates to low self-esteem, depression, and obesity (14).

For years, women have received a general message from the media that their bodies should have an appropriate shape. Researchers evaluated 9,369 scenes from 1,393 music videos and 180 programs, broadcast on music entertainment channels (15). Results obtained showed that 39.3% of the observed scenes contained sexualizing communications, passing the message that

Discussão

O presente estudo é o primeiro a identificar a presença de distorção da imagem corporal em estudantes universitários procedentes da *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*. Estes resultados indicam que as mulheres foram mais propensas a demonstrar preocupação sobre a sua própria imagem corporal, principalmente num nível severo. Não foi encontrada nenhuma relação entre preocupação sobre a forma física e adesão à DM, idade e curso académico. As implicações práticas destes resultados são significativas já que a imagem corporal distorcida está relacionada com a baixa autoestima, depressão e obesidade (14).

Durante anos, as mulheres receberam mensagens por parte dos média de que os seus corpos deveriam ter uma forma determinada. Investigadores avaliaram 9.369 cenas de 1.393 videoclipes e 180 programas transmitidos em canais de entretenimento musical (15). Os resultados obtidos mostraram que 39,3% das cenas observadas continham comunicações sexualizantes, passando

appearance is more important than health (16). Nevertheless, Grabe and coworkers concluded that “overall, thin-ideal media exposure is related to higher levels of body dissatisfaction, stronger internalization of the thin ideal, and more frequent bulimic and anorexic attitudes and behaviors” (14). The same authors concluded that thin-ideal media images negatively affect women’s body image, eating behaviors and beliefs, but also raise the risk of developing low self-esteem, depressive symptoms, and obesity (14). Women’s social surroundings also played a role (17), since parents and peers mediate effects on body dissatisfaction and were important in the transmission, reinforcement, and modeling of the thin ideal or disordered eating beliefs and behaviors (17,18).

As conclusion, our results seems to be in concordance with several other researchers already cited during the present work, observing that the pressure about having the perfect body modifies more women’s behavior than men’s, in general. It is important to note that this relation is observed even in university women students, who are more formed and informed. In terms of future interventions, public health practitioners may find it beneficial to discuss with young women that magazine photos may misrepresent how they feel about their bodies. Discussing the content in a magazine or social media is a good start in raising social media literacy, and possibly in counterbalancing negative influences on body image.

Conclusion

Women were more likely to suffer concerns about their body shape independently of age, academic course or adherence to the Mediterranean diet.

Acknowledgements

The authors acknowledge all the participants.

Conflict of Interests

None of the authors reported no conflicts of interest.

a mensagem de que a aparência é mais importante que a saúde (16). No entanto, Grabe e colaboradores concluíram que “em geral, a exposição à mensagem do ideal de magreza, dos media, está associada a níveis mais altos de insatisfação corporal, internalização mais forte do ideal de delgadez e atitudes e comportamentos bulímicos e anoréxicos mais frequentes” (14). Os mesmos autores concluíram que as imagens de corpo ideal afetam negativamente a imagem corporal, os comportamentos alimentares e as crenças das mulheres, mas também aumentam o risco de desenvolver baixa autoestima, sintomas depressivos e obesidade (14). O ambiente social das mulheres também desempenha um papel muito importante (17), uma vez que os familiares e amigos mediam os efeitos sobre a insatisfação corporal e são importantes na transmissão, reforço e modelagem do ideal de magreza ou das crenças e comportamentos alimentares desordenados (17,18). Como conclusão, os nossos resultados estão de acordo com vários outros investigadores já citados ao longo do presente trabalho, observando que a pressão sobre o corpo perfeito afeta mais o comportamento das mulheres do que o dos homens, em geral. É importante ressaltar que esta relação é observada até mesmo em estudantes universitárias, que, a priori, são mais formadas e informadas. Em termos de intervenções futuras, seria benéfico que os profissionais de saúde pública discutissem com as mulheres jovens que as fotos das revistas podem representar erroneamente o que devem sentir sobre o seu próprio corpo. Discutir o conteúdo de uma revista ou da comunicação social é um bom começo para aumentar a literacia e contrabalançar as influências negativas sobre a imagem corporal.

Conclusão

As mulheres foram mais propensas a demonstrar preocupação sobre a sua própria imagem corporal, independentemente da idade, do curso académico ou da adesão à DM.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes.

Conflito de Interesses

Nenhum dos autores relatou qualquer conflito de interesse.

References/ Referências

1. Cash TF, Pruzinsky T. *Body images: Development, deviance, and change*. New York: Guilford Press; 1990.
2. Petroski EL, Pelegrini A, Glaner MF. Reasons and prevalence of body image dissatisfaction in adolescents. *Cien Saude Colet*. 2012 Apr;17(4):1071–7.
3. Anstine D, Grinenko D. Rapid screening for disordered eating in college-aged females in the primary care setting. *J Adolesc Health*. 2000 May;26(5):338–42.
4. Wardle J, Haase AM, Steptoe A. Body image and weight control in young adults: international comparisons in university students from 22 countries. *Int J Obes (Lond)*. 2006 Apr 6;30(4):644–51.
5. Yaemsiri S, Slining MM, Agarwal SK. Perceived weight status, overweight diagnosis, and weight control among US adults: the NHANES 2003–2008 Study. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Aug 2;35(8):1063–70.
6. Green SP, Pritchard ME. PREDICTORS OF BODY IMAGE DISSATISFACTION IN ADULT MEN AND WOMEN. *Soc Behav Personal an Int J*. 2003 Jan 1;31(3):215–22.
7. Aparicio-Martinez P, Perea-Moreno AJ, Martinez-Jimenez MP, Redel-Macías MD, Pagliari C, Vaquero-Abellan M. Social media, thin-ideal, body dissatisfaction and disordered eating attitudes: An exploratory analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(21).
8. Heiman T, Olenik-Shemesh D. Perceived Body Appearance and Eating Habits: The Voice of Young and Adult Students Attending Higher Education. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Feb 4;16(3):451.
9. Soto Ruiz MN, Marín Fernández B, Ontoso IA, Guillén-Grima F, Serrano Monzó I, Armayor NC, et al. Análisis de la percepción de la imagen corporal que tienen los estudiantes universitarios de Navarra. *Nutr Hosp*. 2015;31(5):2269–75.
10. Ledo-Varela T, De Luis Román DA, González-Sagrado M, Jauregui OI, Conde Vicente R, Aller De La Fuente R, et al. Características nutricionales y estilo de vida en universitarios. *Nutr Hosp*. 2011;26(4):814–8.
11. Bernárdez MM, la Montaña Miguélez DJ, Fernández IM, Rodríguez GM, Carnero GJ. Evaluación de la distorsión de la imagen corporal en universitarios en relación a sus conocimientos de salud. Vol. 29, *Nutr. clín. diet. hosp*. 2009.
12. Cooper PJ, Taylor MJ, Cooper Z, Fairbum CG. The development and validation of the body shape questionnaire. *Int J Eat Disord*. 1987 Jul;6(4):485–94.
13. Di Pietro M, Da Silveira DX. Internal validity, dimensionality and performance of the Body Shape Questionnaire in a group of Brazilian college students. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009;31(1):21–4.
14. Grabe S, Ward LM, Hyde JS. The role of the media in body image concerns among women: a meta-analysis of experimental and correlational studies. *Psychol Bull*. 2008 May;134(3):460–76.
15. Vandenbosch L, Vervloessem D, Eggermont S. “I Might Get Your Heart Racing in My Skin-Tight Jeans”: Sexualization on Music Entertainment Television. *Commun Stud*. 2013 Apr;64(2):178–94.
16. Willis LE, Knobloch-Westerwick S. Weighing women down: messages on weight loss and body shaping in editorial content in popular women’s health and fitness magazines. *Health Commun*. 2014 Apr 21;29(4):323–31.
17. Kremer M, Giles S, Helme D. Understanding the Process: How Mediated and Peer Norms Affect Young Women’s Body Esteem. *Commun Q*. 2008 May 9;56(2):111–30.
18. López-Guimerà G, Levine MP, Sánchez-carracedo D, Fauquet J. Influence of Mass Media on Body Image and Eating Disordered Attitudes and Behaviors in Females: A Review of Effects and Processes. *Media Psychol*. 2010 Nov 30;13(4):387–416.
19. Cash TF. *Body image: Past, present, and future*. Vol. 1, *Body Image*. Elsevier; 2004. p. 1–5.

Food allergy (Clinical case)

Alergia alimentar (Caso clínico)

Ariana Saraiva¹, António Raposo²

¹Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal.

²CBIOS (Reserch Center for Biosciences and Health Technologies), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

Email: antonio.raposo@ulusofona.pt

Received / *Recebido*: 15/04/2019

Accepted / *Aceite*: 01/10/2019

Electronic Edition: www.alies.pt

A 27-year-old student woman has symptoms of allergic reaction when she eats eggs or peanuts. It manifests with a skin irritation. She has inclusive severe allergic reaction, feeling weakness or difficulty breathing. General practitioner medicated her with Zyrtec. She was sent to the Nutrition Consultation to help her to choose the right foods, avoiding allergic ingredients.

Anthropometric evaluation

Weight: 53 kg

Height: 164 cm

BMI: 19.9 kg/m²

Waist circumference: 90 cm

Assessment of body composition (TANITA BC-545N)

Body fat: 21.6%

Total body water: 58.1 %

Analytical Parameters:

Hematology

Leukocytes: 6.7 x 10⁹/L (4.0-10.0)

Erythrocytes: 4.53 x 10¹²/L (3.90-5.20)

Hemoglobin: 13.5 g/dL (12.0-16.0)

Hematocrit: 39.2 % (34.7-46.0)

Glycated hemoglobin (A1C): 5% (<5.7)

Biochemistry

Glucose: 66 mg/dL (50-100)

Urea: 27 mg/dL (<50)

Creatinine: 0.68 mg/dL (<1.2)

Uric acid: 2.5 mg/dL (2.4-6.0)

Total cholesterol: 137 mg/L (<200)

Uma estudante de 27 anos apresenta sintomas de reacção alérgica ao ingerir ovos ou amendoins. Esta alergia manifesta-se através de uma irritação da pele. Ela tem reacção alérgica grave inclusive, sentindo fraqueza ou dificuldade em respirar. O médico de clínica geral medicou-a com Zyrtec e reencaminhou-a para a Consulta de Nutrição para poder escolher os alimentos certos, evitando ingredientes alérgicos.

Avaliação antropométrica

Peso: 53 kg

Altura: 164 cm

IMC: 19,9 kg/m²

Circunferência da cintura: 69 cm

Avaliação da composição corporal (TANITA BC-545N)

Gordura corporal: 21,6%

Água corporal total: 58,1%

Parâmetros analíticos:

Hematologia

Leucócitos: 6,7 x10⁹ / L (4,0-10,0)

Eritrócitos: 4,53 x 10¹² / L (3,90-5,20)

Hemoglobina: 13,5 g / dL (12,0-16,0)

Hematócrito: 39,2% (34,7-46,0)

Hemoglobina glicada (A1C): 5% (<5,7)

Bioquímica

Glicose: 66 mg / dL (50-100)

Uréia: 27 mg / dL (<50)

Creatinina: 0,68 mg / dL (<1,2)

Ácido úrico: 2,5 mg / dL (2.4-6.0)

Colesterol total: 137 mg / L (<200)

HDL cholesterol: 56 mg/L (>59)
LDL cholesterol: 78 mg/L (<130)
Triglycerides: 56 mg/L (<150)
Alanine Aminotransferase: 8 U/L (<45)
Aspartate Aminotransferase: 17 U/L (<32)
Gama Glutamyltransferase: 9 U/L (<42)
Iron: 139 µg/dL (60-170)

Hormonology

Thyroid Function:
Free T4: 1.2 ng/Dl (0.7-1.8)
TSH: 2.8 mUI/L (0.4-4.2)

Anemia

Ferritin: 16.6 µg/L (50.0-200.0)
Folic Acid: 2.9 µg/L (> 4.5)
Vitamin B12: 432 µg/L (> 200)

Clinical evaluation:
Personal background:
Asthma
Allergic rhinitis

Medication:
Zyrtec

Intestinal transit: regular

Eating habits:
Wake up at 9:00 a.m.
Breakfast: cereals with chocolate
During morning: 1 apple
Lunch: 1:00 p.m.
Dish: half a plate with noodles or rice and the other with meat (100 g) + salad (30 g)
Drink water (200 ml)
During afternoon:
milk with chocolate (220 ml) + one bread with one slice of ham
Yogurt with strawberry
Dinner: 8:00 p.m.
One plate of soup
Between dinner and time to sleep: one apple
Lie down: 12 p.m.
Water consumed: about 1 L per day

Environment, behavior and social:

She does exercises about 5 days per week.
She has the habit to snack while studying and likes to

Colesterol HDL: 56 mg / L (> 59)
Colesterol LDL: 78 mg / L (<130)
Triglicerídeos: 56 mg / L (<150)
Alanina aminotransferase: 8 U / L (<45)
Aspartato aminotransferase: 17 U / L (<32)
Gama Glutamyltransferase: 9 U / L (<42)
Ferro: 139 µg / dL (60-170)

Hormonologia

Função tiroideia:
T4 livre: 1,2 ng / Dl (0,7-1,8)
TSH: 2,8 mUI / L (0,4-4,2)

Anemia

Ferritina: 16,6 µg / L (50,0-200,0)
Ácido fólico: 2,9 µg / L (> 4,5)
Vitamina B12: 432 µg / L (> 200)

Avaliação clínica:
Antecedentes pessoais:
Asma
Rinite alérgica

Medicação:
Zyrtec

Trânsito intestinal: regular

Hábitos alimentares:
Acorda às 9:00
Pequeno-almoço: cereais com chocolate
Durante a manhã: 1 maçã
Almoço: 13:00
Prato: meio prato com massa ou arroz e outra metade com carne (100 g) + salada (30 g)
Bebe água (200 ml)
Durante a tarde:
leite com chocolate (220 ml) + um pão com uma fatia de presunto
Iogurte de morango
Jantar: 20:00
Um prato de sopa
Entre o jantar e a hora de dormir: uma maçã
Deita-se às 24:00
Água consumida: cerca de 1 L por dia

Ambiente, comportamento e social:

A estudante faz exercícios cerca de 5 dias por semana.
Ela tem o hábito de fazer um lanche enquanto estuda

eat in fast food restaurants.
She does not like to eat potatoes and does not eat much fish nor vegetables.

Questions:

- 1 - What is an allergic reaction?
- 2 - Is the allergic reaction to food dangerous?
- 3 - The food to which she is allergic compromised a balanced diet?
- 4 - What foods she has to avoid?

Answers:

- 1 - An allergic reaction is an adverse reaction produced by immune system because of the exposition to an allergen. It can be IgE-mediated and no IgE-mediated or the two responses. When IgE antibody is produced there is development of symptoms. (1,2)
- 2 - The allergic reaction to food can be very dangerous because of allergic anaphylaxis. This is a severe response in susceptible individuals that can lead to death or permanent damage. It is essential to avoid the exposure of allergenic factors that can lead to exacerbation. (3-5)
- 3 - When someone has an allergic reaction to a complete food such eggs, composed of quality proteins, vitamins and minerals, it is necessary to replace with an increase of vegetables, cereals, fruits and red meat. (6)
- 4 - She has to avoid all foods with the allergenic factors: peanuts and eggs. She cannot eat cakes with eggs, only vegan eggs, nor can she eat ice cream and noodles that have egg in their composition. She needs to be careful with sauces normally used in sandwiches, such as mayonnaise. It is very important that she ask before buying every product with potential allergic ingredients. (7) Some individuals that have allergic reactions to eggs are also sensitive to poultry meat, so its avoidance is recommended. She must read the labels of food to guarantee the absence of eggs due to their extensive utilization. (1,8)

(na maioria das vezes come bolachas) e gosta de comer em restaurantes de fast food.

Ela não gosta de comer batatas e não come muito peixe nem legumes.

Questões:

1. O que é uma reação alérgica?
2. A reacção alérgica à comida é perigosa?
3. A comida que a estudante é alérgica compromete uma dieta equilibrada?
4. Quais alimentos que ela tem de evitar?

Respostas:

1. Uma reacção alérgica é uma reacção adversa produzida pelo sistema imunológico devido à exposição a um alérgeno. Pode ser mediada por IgE e não mediada por IgE ou poderá ter duas respostas. Quando o anticorpo IgE é produzido, há desenvolvimento de sintomas. (1,2)
2. A reacção alérgica aos alimentos pode ser muito perigosa devido à reacção de anafilaxia. Esta é uma resposta severa em indivíduos susceptíveis que pode levar à morte ou a danos permanentes. É essencial evitar a exposição de factores alérgicos que podem levar à exacerbação. (3-5)
3. Quando alguém tem reacção alérgica a um alimento completo como os ovos, compostos por proteínas, vitaminas e minerais de qualidade, é necessário repor estes nutrientes aumentando o consumo de vegetais, cereais, frutas e carne vermelha. (6)
4. Ela tem de evitar todos os alimentos com factores alérgicos: amendoins e ovos. Não pode comer bolos com ovos, somente pode ingerir os bolos veganos, não pode consumir gelados e massa com ovo na sua composição. Tem de ter cuidado com os molhos normalmente usados para rechear as sandes, como a maionese. É muito importante questionar antes de comprar todos os produtos com potenciais ingredientes que lhe provocam alergia. (7) Algumas pessoas que têm reacções alérgicas aos ovos também são sensíveis à carne de aves, por isso é recomendável evitá-la. A estudante precisa de ler os rótulos dos alimentos para garantir a ausência de ovos devido à sua ampla utilização. (1,8)

References/Referências

1. Carrapatoso, I., Prates, S., & Costa, C. (2017). *Alergia Alimentar: Conceitos, Conselhos e Precauções*. Brasil, Thermo Fischer, 1 Ed., p.103-111.
2. Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., & Pahr, S. (2015). Food allergies: the basics. *Gastroenterology*, 148(6), 1120-1131.
3. Raposo, A., Pérez, E., Tinoco de Faria, C., & Carrascosa, C. (2017). Allergen Management as a Key Issue in Food Safety. In *Food Safety and Protection* (pp. 195-241). CRC Press.
4. Ferreira, H., Ferreira, C., Silva, A., Costa, A., & Pedrosa, C. (2015). Anafilaxia e alergia alimentar: O resultado de uma intervenção na comunidade. *Nascer e Crescer*, 24(3), 103-107.
5. Sarinho, E., & Lins, M. D. G. M. (2017). Formas graves de alergia alimentar. *Jornal de Pediatria*, 93(1), 53-59.
6. Worm, M., Eckermann, O., Döller, S., Aberer, W., Beyer, K., Hawranek, T., ... Ruëff, F. (2014). Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4000 cases from Germany, Austria and Switzerland. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(21), 367.
7. Turner, P. J., Baumert, J. L., Beyer, K., Boyle, R. J., Chan, C. H., Clark, A. T., ... & Grabenhenrich, L. (2016). Can we identify patients at risk of life-threatening allergic reactions to food?. *Allergy*, 71(9), 1241-1255.
8. Turnbull, J. L., Adams, H. N., & Gorard, D. A. (2015). The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(1), 3-25.

Texture analysis is a useful tool to characterize the cutaneous biomechanical profile

A análise de textura é uma ferramenta útil para caracterizar o perfil biomecânico cutâneo

Henrique Silva^{1,2}, Francisco Rego³, Rafaela Francisco², L. Monteiro Rodrigues^{1,2}

¹U Lusófona, School of Health Sc & Technologies, CBIOS (Research Center for Biosciences and Health Technologies),
Campo Grande 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

²U Lisboa, Faculty of Pharmacy, Pharmacol. Sc Depart - Lisboa, Portugal

³U Lisboa, Instituto Superior Técnico, Institute for Systems and Robotics (ISR), Lisboa, Portugal

Email: henrique.silva@ulusofona.pt

Abstract

Skin displays viscoelastic properties, which allow it to sustain deformation in virtually all directions without breaking. Most devices to quantify viscoelasticity suffer from the drawback of assessing only a limited range of angles. Cutiscan[®] CS 100 is a recently introduced device that allows quantification of skin viscoelasticity by creating skin suction and recording the consequent displacement in a video. Displacement videos (baseline – 0.50s; suction – 0.50-2.50s; recovery – 2.50-3.00s) of ten female subjects (24.5 ± 6.2 y.o.) were obtained on the volar surface of the forearm after informed written consent. Videos were decomposed into their corresponding frames, of which a region of interest was selected and several texture analysis (TA) parameters were calculated – entropy, contrast, correlation, energy, homogeneity. During suction entropy and correlation increased significantly, while energy decreased significantly. Contrast and homogeneity changed without significance. During recovery the entropy and correlation remained significantly elevated relative to baseline, suggesting that a full recovery did not take place. These results seem to confirm the usefulness of texture analysis for the purposes of skin viscoelasticity quantification based on skin displacement videos, which justifies further developments.

Keywords: skin biomechanics, Cutiscan[®], texture analysis, dynamic parameters

Resumo

A pele apresenta propriedades viscoelásticas, que lhe permitem sofrer deformação em praticamente todas as direções, sem sofrer quebra. A maioria dos aparelhos de quantificação da viscoelasticidade sofrem da desvantagem de avaliar uma gama limitada de ângulos. O Cutiscan[®] CS 100 é um dispositivo introduzido recentemente que permite quantificar a viscoelasticidade da pele através da sucção da pele e gravação em vídeo do seu subsequente deslocamento. Foram obtidos vídeos de deslocamento da pele (basal - 0.50s; sucção - 0.50-2.50s; recuperação - 2.50-3.00s) de dez voluntários do sexo feminino ($24,5 \pm 6,2$ anos) da superfície anterior do antebraço, após consentimento informado por escrito. Os vídeos foram decompostos nas suas imagens correspondentes, nas quais foi selecionada uma região de interesse na qual foram calculados vários parâmetros de análise de textura (AT) - entropia, contraste, correlação, energia, homogeneidade. Durante a sucção a entropia e correlação aumentaram significativamente, enquanto que a energia diminuiu significativamente. O contraste e a homogeneidade não sofreram alterações significativas. Durante a recuperação a entropia e correlação permaneceram significativamente elevadas em relação à fase basal, o que sugere que não ocorreu uma recuperação completa. Estes resultados parecem confirmar a utilidade da AT para fins de quantificação da viscoelasticidade cutânea com base em vídeos de deslocamento, o que justifica desenvolvimentos futuros.

Palavras-Chave: biomecânica cutânea, Cutiscan[®], análise de textura, parâmetros dinâmicos

Introduction

Skin is the largest organ in the human body, displaying known viscoelastic properties that allow it to sustain deformation in virtually all directions without breaking (1). Skin viscoelastic properties have been investigated by a variety of methodologies over the years. Regarding testing methods, five classes can be mentioned, including tensile, torsional, indentation, impact, and elevation (by suction), with the latter receiving wider interest over the last decades. Regarding the most used quantification devices, Cutometer[®] operates by creating a skin suction with the consequent skin displacement being assessed by an optical system, while Reviscometer[®] quantifies the resonance time of transmitted skin vibrations. Both these devices suffer from the same drawback which is the limited range of angles they are able to quantify (2). The Cutiscan[®] CS 100 device, recently introduced, aims to modernize viscoelasticity quantification by providing a simultaneous 360° angle quantification and recording it with a video camera. This video recording is constituted of a sequence of amplified photographs of the skin surface, which display a complex, irregular, and multi-patterned morphology, thereby constituting a good candidate for texture analysis (TA). TA is an analytical tool to quantify the features of a texturally rich gray-level image and has been applied in medical imaging with the purpose of improving diagnostic capacity, given that the human visual is both time-consuming and prone to misinterpretation errors (3). Until now, the quantification of Cutiscan[®] parameters has been performed from the analysis of 2D and 3D representations of viscoelasticity. (2,4) The Cutiscan[®] device, despite its enormous potential, remains underexplored in terms of analytical tools, which hinder its dissemination. Our aim was to explore texture analysis of the Cutiscan[®] skin displacement video as an analytical tool to quantify skin viscoelasticity.

Materials and Methods

Ten female Caucasian subjects with healthy skin (24.5 ± 6.2 y.o.) participated in this study after giving written informed consent. With the subjects sitting upright, the Cutiscan[®] probe was placed against the skin of the middle portion of the forearm volar surface. Care was taken to select regions free of hair and desquamation, which would negatively affect the analysis. A negative

Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano, exibindo conhecidas propriedades viscoelásticas que lhe permitem sofrer deformação em praticamente todas as direções, sem sofrer quebra. (1) As propriedades viscoelásticas cutâneas têm sido investigadas por uma variedade de metodologias ao longo dos anos. Quanto aos métodos de avaliação, podem ser incluídos em cinco classes, incluindo tracção, torção, recuo, impacto, e elevação (por sucção), tendo este último recebido maior interesse nas últimas décadas. Em relação aos dispositivos de medição mais utilizados, o Cutometer[®] opera através de uma sucção da pele sendo o deslocamento cutâneo subsequente avaliado por um sistema óptico, enquanto o Reviscometer[®] quantifica o tempo de ressonância das vibrações transmitidas pela pele. Ambos estes dispositivos sofrem da mesma desvantagem que é a gama limitada de ângulos que são capazes de quantificar (2). O dispositivo Cutiscan[®] CS 100, introduzido recentemente, tem por objectivo modernizar a quantificação da viscoelasticidade, permitindo a sua quantificação simultânea ao longo de 360° ângulos, gravando-a em vídeo. Esta gravação em vídeo constitui uma sequência de fotografias ampliadas da superfície da pele, que apresentam uma morfologia complexa, irregular e com múltiplos padrões, constituindo assim um bom candidato para análise de textura (AT). A AT é uma ferramenta analítica de quantificação das características de uma imagem em escala de cinza texturalmente rica e tem sido aplicada a imagens médicas com a finalidade de melhorar a capacidade de diagnóstico, uma vez que a avaliação humana é demorada e propensa a erros de interpretação (3). Até agora, a quantificação dos parâmetros de Cutiscan[®] foi realizada a partir da análise de representações 2D e 3D da viscoelasticidade (2,4). Apesar do seu enorme potencial o Cutiscan[®] permanece ainda pouco explorado em termos de instrumentação analítica, o que dificulta a sua divulgação. O nosso objetivo foi a exploração da AT de vídeos de deslocamento cutâneo feitos com Cutiscan[®] como uma ferramenta analítica para quantificação da viscoelasticidade cutânea.

Materiais e métodos

Dez indivíduos caucasianos do sexo feminino com pele saudável ($24,5 \pm 6,2$ anos) participaram neste estudo depois de dar o seu consentimento informado por escrito. Com os sujeitos sentado na posição vertical, a sonda de Cutiscan[®] foi colocada em contacto com a pele ao nível da porção média da superfície palmar do antebraço.

suction pressure of 400 mbar was applied for 2 seconds, within a protocol totaling of 3 seconds - baseline (0.0 – 0.50s), suction (0.50 – 2.50s) and recovery (2.50 – 3.00s), which was recorded on video by the device. Skin displacement videos (1280×1024 resolution) were imported to Matlab® (Mathworks, USA) and decomposed into their individual frames. During suction the skin is pulled towards the probe camera, and the corresponding height of displacement (h_{disp}) is measured in terms of pixels (px) for each of the 360° degrees, with the device firmware producing a standard viscoelasticity curve. For the extraction of textural parameters, a squared region of interest (ROI) was selected in the center of each video frame (see Figure 1A), which was subsequently transformed into a gray-level co-occurrence matrix (GLCM) by the examination of the spatial relationship of pixels. Based on this GLCM the calculation of the following textural parameters (5,6) from a built-in algorithm was performed:

Contrast – the measure of the intensity contrast between a pixel and its neighbor over the whole image

Correlation – the correlation between adjacent pixels over the entire image.

Energy – returns the sum of squared elements in the GLCM

Homogeneity – the measure of the closeness of the distribution of elements in the GLCM to the GLCM diagonal

Entropy – the measure of randomness which can be used to characterize the texture of the input image.

The frames corresponding to three phases (baseline, suction, recovery) of skin displacement were selected and the textural parameters were calculated for each phase and statistically compared using the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$).

Foi tido cuidado para selecionar apenas regiões livres de pêlo e de descamação, que afetariam negativamente a análise. Foi aplicada uma pressão negativa de sucção de 400 mbar durante 2 segundos, para um total de 3 segundos de protocolo – basal (0,0 - 0.50s), sucção (0,50 - 2.50s) e recuperação (2,50 - 3.00s), que foi gravado em vídeo pelo dispositivo. Os vídeos de deslocamento cutâneo (resolução de 1280 × 1024) foram importados para o Matlab® (Mathworks, EUA) e decompostos nas suas imagens individuais. Durante a sucção a pele é puxada contra a câmara que está montada na sonda, e é medida a altura correspondente do deslocamento (h_{disp}) em termos de pixels (px) para cada um dos 360 graus, sendo produzida pelo software dedicado do dispositivo uma curva padrão de viscoelasticidade. Para efeitos de extração dos parâmetros de textura, foi selecionada uma região de interesse (RI) de formato quadrangular no centro de cada imagem do vídeo (ver Figura 1A), que foi subsequentemente transformada numa matriz de co-ocorrência (MCO) em de escala de cinza pela avaliação da relação espacial entre os pixels. Com base nesta MCO foi feito o cálculo dos seguintes parâmetros texturais (5,6) a partir de um algoritmo de raiz do software:

Contraste – mede o contraste de intensidade entre um pixel e seu vizinho ao longo de toda a imagem

Correlação – mede a correlação entre os pixels adjacentes ao longo de toda a imagem

Energia – devolve a soma de elementos quadrados na MCO

Homogeneidade – mede a proximidade da distribuição de elementos na MCO à diagonal da MCO

Entropia – mede a aleatoriedade e pode ser usada para caracterizar a textura da imagem inicial

Foram selecionadas imagens correspondentes às três fases (basal, sucção, recuperação) do deslocamento cutâneo, calculando-se os parâmetros texturais para cada fase, sendo comparados estatisticamente com o teste de Wilcoxon ($p < 0.05$).

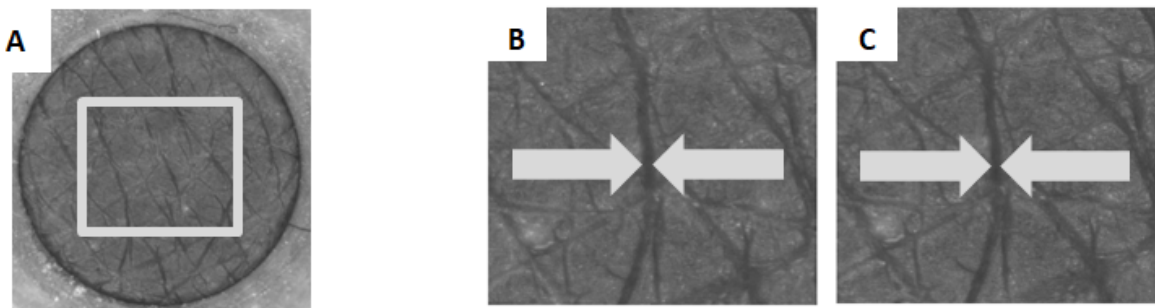


Figure 1/ Figura 1 - Forearm skin photo taken with CutiScan® camera, with a superimposed ROI (A); amplification of the forearm skin photo highlighting the furrow width during baseline (B) and during suction (C). Data from a 32 y.o. subject./ Fotografia da pele do antebraço obtida com a câmara do Cutiscan® com uma região de interesse sobreposta (A); ampliação da foto da pele salientando a largura do sulco durante a fase basal (B) e durante a sucção (C). Dados de uma voluntária de 32 anos.

Results and Discussion

Figure 2 shows the time evolution of the mean h_{disp} and mean textural parameters during skin displacement following the suction challenge, which are presented for each phase on Table 1.

Resultados e Discussão

A Figura 2 mostra a evolução temporal da h_{disp} média e do valor médio dos parâmetros de textura durante o deslocamento cutâneo a seguir à sucção, que se apresentam por cada fase na Tabela 1.

Table 1/ Tabela 1 - Mean and standard deviation (sd) of the height of displacement (h_{disp}) and of the textural parameters in each phase of the suction protocol. Statistical comparison to baseline is presented (* - $p < 0.05$). / Média e desvio-padrão (dp) da altura de deslocamento (h_{disp}) e dos parâmetros texturais em cada fase do protocolo de sucção. É apresentada a comparação estatística com a fase basal (* - $p < 0.05$).

Parameter / Parâmetro		Baseline / Basal	Suction / Sucção	Recovery / Recuperação
h_{disp}	\bar{x}	30.9	66.9	36.5
	sd / dp	10.2	14.1	13.0
	p	-	0.028*	0.463
Entropy / Entropia	\bar{x}	5.130	5.171	5.134
	sd / dp	0.180	0.176	0.156
	p	-	0.036*	0.028*
Contrast / Contraste	\bar{x}	0.057	0.064	0.055
	sd / dp	0.021	0.018	0.020
	p	-	0.053	0.257
Correlation / Correlação	\bar{x}	0.689	0.706	0.703
	sd / dp	0.057	0.052	0.058
	p	-	0.018*	0.042*
Energy / Energia	\bar{x}	0.760	0.721	0.752
	sd / dp	0.113	0.105	0.138
	p	-	0.049*	0.075
Homogeneity / Homogeneidade	\bar{x}	0.972	0.968	0.972
	sd / dp	0.011	0.009	0.010
	p	-	0.180	0.157

h_{disp} increased and reached a maximum at 1.00s, followed by a plateau phase until 1.50s and finally by a decrease until 3.00s. h_{disp} increase was found to be statistically significant relative to baseline ($p=0.028$), while no difference was noted during recovery, suggesting a mechanical recovery. A more irregular profile was observed for the textural parameters. Shortly after the 0.50s mark, a sharp change was noted for all parameters, marking the immediate skin response to the application of suction. With the sustaining of suction, parameters did not attain a plateau phase, but a rather irregular evolution of the parameters was noted. This irregularity likely reflects skin anisotropy, on the one hand, and, on the other, the overall textural complexity of the skin lattice. The magnitude of all parameters changed during the suction phase, with some changing in the same direction that of h_{disp} , some in the opposite direction. During suction skin is deformed towards the

A h_{disp} aumentou tendo alcançado um máximo aos 1.00s, seguindo-se uma fase de *plateau* até aos 1.50s e, finalmente, uma diminuição até aos 3.00s. O aumento de h_{disp} foi estatisticamente significativo em relação à fase basal ($p=0.028$), enquanto que durante a recuperação não foi observada nenhuma diferença face à fase basal, o que sugere uma recuperação mecânica. Para os parâmetros texturais foi observado um perfil mais irregular. Logo após os 0.50s, foi observada uma mudança em todos os parâmetros, o que assinala a resposta imediata da pele perante a aplicação da sucção. Com a manutenção da sucção, os parâmetros não atingiram uma fase de *plateau*, tendo-se observado uma evolução bastante irregular. Esta irregularidade reflete provavelmente, por um lado, a anisotropia da pele e, por outro lado, a complexidade textural geral da estrutura da pele. Todos os parâmetros sofreram uma alteração de magnitude durante a fase de sucção, alguns no mesmo

center of the field, with the consequent narrowing of the furrows and rising of the ridges (see Figure 2B-C), which changes overall skin lattice morphology, with an obvious translation in terms of its textural parameters. Entropy, contrast, and correlation increased irregularly until 2.00s and then decreased until 3.00s. The increase of entropy and correlation during suction was found to be statistically significant ($p=0.036$ and $p=0.018$, respectively), and remained significantly elevated after suction ended ($p=0.028$ and $p=0.042$, respectively). Contrast also increased with suction, but without statistical significance. Energy and homogeneity, however, decreased during suction but only with statistical significance for the former ($p=0.049$). During recovery, only entropy and correlation showed statistical differences regarding baseline ($p=0.028$ and $p=0.042$, respectively), suggesting that skin did not fully recover in these conditions. Displaced skin is bent in many different directions, which adds complexity to its surface architecture and increases textural entropy. With furrow narrowing, the images become more homogenous, especially towards the center, which explains the resulting reduction in homogeneity and the increase in overall pixel frame correlation. The narrowing of furrows further increased

sentido de h_{disp} , outros no sentido contrário. Durante a sucção a pele é deformada em direção ao centro do campo, verificando-se um consequente estreitamento dos sulcos e aumento das papilas (Figura 2B-C), com uma alteração da morfologia global da estrutura cutânea, com uma tradução evidente em termos dos seus parâmetros texturais. A entropia, contraste e correlação aumentaram irregularmente até aos 2.00s, e diminuíram de seguida até aos 3.00s. O aumento da entropia e correlação durante a sucção verificou-se ser estatisticamente significativo ($p=0.036$ e $p=0.018$, respectivamente), mantendo-se significativamente elevados após o fim da sucção ($p=0.028$ e $p=0.042$, respectivamente). O contraste aumentou também com a sucção, mas sem significância estatística. A energia e a homogeneidade, no entanto, diminuíram com a sucção, mas apenas com significância estatística no primeiro caso ($p=0.049$). Durante a recuperação, apenas a entropia e correlação mostraram diferenças estatísticas em relação à fase basal ($p=0.028$ e $p=0.042$, respectivamente), sugerindo que, nestas condições, a pele não recuperou totalmente. A pele que sofreu deslocamento é dobrada em muitas direções diferentes, o que acrescenta complexidade à sua arquitetura superficial, aumentando a entropia textural.

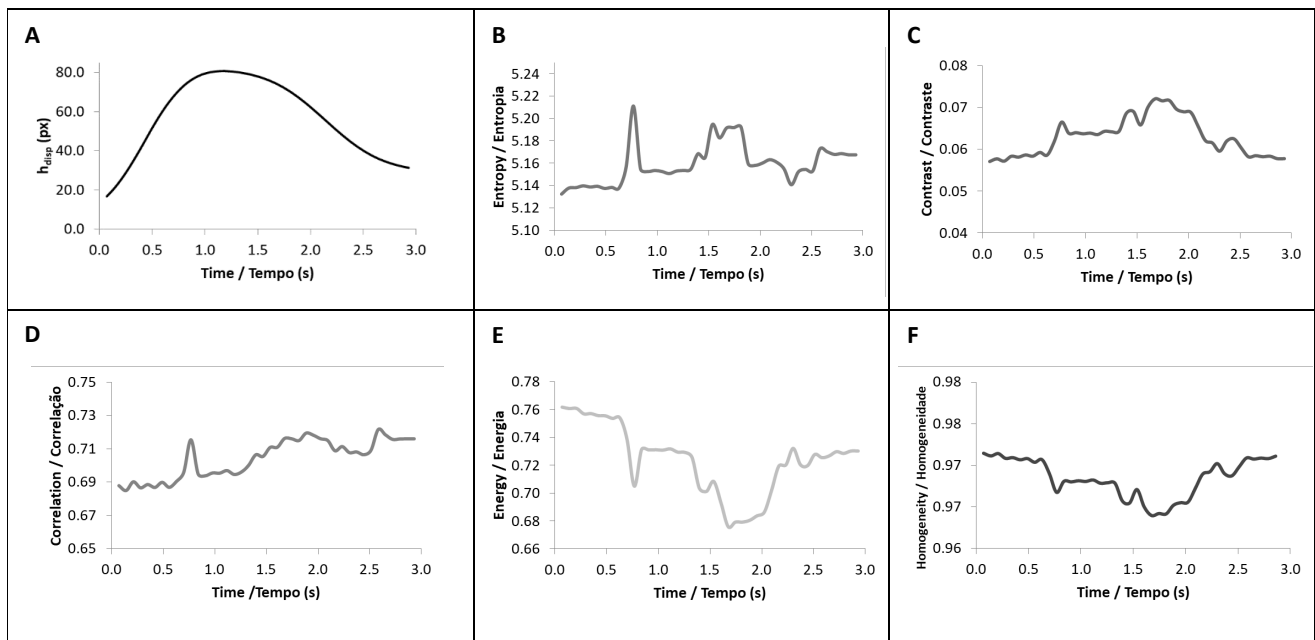


Figure 2/ Figura 2 - Mean time evolution (baseline: 0.0-0.5s; suction: 0.5-1.5s; recovery: 1.5-2.0s) of h_{disp} (A) and of the textural parameters [entropy (B); contrast (C); correlation (D); energy (E); homogeneity (F)]/ Evolução temporal média (basal: 0.0-0.5s; sucção: 0.5-1.5s; recuperação: 1.5-2.0s) da h_{disp} (A) e dos parâmetros texturais [entropia (B); contraste (C); correlação (D); energia (E); homogeneidade (F)]

the definition of the individual ridges, which justifies the increase in contrast. Given that furrows are darker areas while ridges are brighter, it is logical that energy should increase during suction. Although texture analysis has been employed in dermatoscopy for diagnostic purposes (7-9), to our knowledge this is the first time that it has been employed to quantify skin viscoelasticity. In the present conditions, entropy and correlation showed higher sensitivity, while contrast and homogeneity showed the lowest sensitivity. Texture analysis presented contradictory results regarding the mechanical recovery to suction, as entropy and correlation suggested that a full recovery was not attained by the end of the challenge, while energy supported the opposite. Further studies should be performed in different experimental conditions to improve the robustness of the proposed methodology.

Conclusion

These results seem to confirm the usefulness of texture analysis for the purposes of skin viscoelasticity quantification based on skin displacement videos, which justifies further developments.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the FCT-IP project UID/DTP/04567/2016 for the funding to carry out this work. The authors would also like to express their thanks to the subjects that participated in this study.

Conflict of Interests

All authors declared no conflict of interests.

Com o estreitamento dos sulcos, as imagens tornam-se mais homogêneas, especialmente próximo do centro, o que explica a resultante diminuição na homogeneidade e o aumento da correlação geral da imagem em termos de pixels. O estreitamento dos sulcos aumentou ainda mais a definição das cristas individuais, o que justifica o aumento do contraste. Dado que os sulcos são áreas mais escuras e as cristas mais brilhantes, é lógico que a energia deve aumentar durante a sucção. Embora a AT tenha sido usada em dermatosopia para fins de diagnóstico (7-9), de acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira vez em que é usada para quantificar a viscoelasticidade da pele. Nas presentes condições, a entropia e correlação mostraram mais uma sensibilidade mais elevada, enquanto que o contraste e a homogeneidade mostraram uma sensibilidade reduzida. A AT revelou resultados contraditórios em termos de recuperação mecânica à sucção, sugerindo a entropia e a correlação a ausência de uma recuperação completa no final do teste, enquanto que a energia apoia uma conclusão oposta. Estudos adicionais deverão ser realizado em diferentes condições experimentais para melhorar a robustez do método proposto.

Conclusão

Estes resultados parecem confirmar a utilidade da análise de textura para fins de quantificação da viscoelasticidade cutânea com base em vídeos de deslocamento, justificando desenvolvimentos futuros.

Agradecimentos

Os autores querem agradecer ao projecto FCT-IP/DTP /04567/2016 pelo financiamento para realizar este trabalho. Os autores gostariam também de expressar os seus agradecimentos aos voluntários pela sua participação neste estudo.

Conflito de Interesses

Os autores não declararam qualquer conflito de interesses.

References/ Referências

1. Ruvolo Jr EC, Stamatias GN, Kollias N. Skin viscoelasticity displays site-and age-dependent angular anisotropy. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2007;20(6):313-21.
2. Rosado C, Antunes F, Barbosa R, Fernando R, Estudante M, Silva HN, Rodrigues LM. About the in vivo quantitation of skin anisotropy. *Skin Research and Technology*. 2017; 23(3):429-36.
3. Larroza A, Bodí V, Moratal D. Texture analysis in magnetic resonance imaging: review and considerations for future applications. Assessment of cellular and organ function and dysfunction using direct and derived MRI methodologies. 2016; 26:75-106.
4. Silva H, Rego F, Rosado C, Rodrigues LM. Novel 3D “ active ” representations of skin biomechanics. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2016; 13(2): 219–227.<https://doi.org/10.19277/bbr.13.2.140>
5. World Health Organization. Handbook for good clinical research practice (GCP): guidance for implementation.
6. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
7. Yusof NS, Dewi DE, Faudzi AA, Salih NM, Bakar NA, Hamid HA. Ultrasound imaging characterization on tissue mimicking materials for cardiac tissue phantom: Texture analysis perspective. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 2017; 17;13(4-2):501-8.
8. Gonzalez RC, Eddins SL, Woods RE. Digital image publishing using MATLAB. Prentice Hall; 2004.
9. Barata C, Celebi ME, Marques JS. A survey of feature extraction in dermoscopy image analysis of skin cancer. *IEEE journal of biomedical and health informatics*. 2018 Jun 11;23(3):1096-109.

Studying the human lower limb perfusion dynamics with the step in place model

Estudo da perfusão dinâmica no membro inferior humano, com o modelo "step in place"

Margarida Florindo^{1,2}, Sérgio Nuno^{2,3,4}, L. Monteiro Rodrigues^{2,5}

¹Escola Superior de Saúde Cruz Vermelha Portuguesa (ESSCVP), Portuguese Red Cross Health School. Área de Ensino de Fisioterapia, Department of Physiotherapy. Lisboa, Portugal

²Universidade Lusófona CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

³Clínica S João de Deus – CTD, Lisboa Portugal

⁴Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – Instituto Politécnico de Lisboa, ESTeSL Polytechnic Institute of Lisbon, Av. D. João II, Lote 4.69.01 | 1990-096 Lisboa, Portugal

⁵Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy, Pharmacol. Sc Depart., Lisboa, Portugal
Email: mflorindo@esscvp.eu

Abstract

The characterisation of microcirculation can be an important diagnostic instrument in vascular medicine. The aim of this study is to evaluate the impact of the basic movement of walking, under controlled conditions, on the foot microcirculation. Fifteen healthy volunteers (24.5 ± 6.5 years old) both sexes, were selected (7 female and 8 male). Under standardised conditions, volunteers were asked to execute a protocol divided into three phases: one minute in a resting standing position (Phase 1); one minute performing a step in place routine (Phase 2); and, one minute to recover back to the resting standing (Phase 3). The blood volume changes were assessed non-invasively by photoplethysmography (PPG) and by polarised spectroscopy (TiVi), and the gastrocnemius activity assessed by surface electromyography (EMG). Results have shown a consistent increase of perfusion related with the proposed activity, where significant higher values of CRBC for men were found in Phases 2 and 3. Further studies are needed to better understand the interest and potential of this model in microcirculatory physiology and pathophysiology.

Keywords: Movement and perfusion; microcirculation; blood volume; concentration of red blood cells

Resumo

A caracterização da microcirculação pode ser um importante instrumento de diagnóstico da área da saúde vascular. O objetivo deste estudo consiste em avaliar o impacto de movimentos simples como caminhar em condições controladas, na circulação periférica do pé. Quinze voluntários saudáveis (24.5 ± 6.5 anos de idade) de ambos os sexos foram selecionados (7 do sexo feminino e 8 do masculino). Os voluntários realizaram um protocolo em condições padronizadas, dividido em 3 fases: 1 minuto na posição de pé em repouso (fase 1); 1 minuto a realizar uma rotina de passo no mesmo local (fase 2) e 1 minuto de recuperação, na posição de pé (fase 3). As alterações no volume sanguíneo foram avaliadas no pé, com os métodos não-invasivos de fotoplethysmografia (PPG) e espectroscopia polarizada (TiVi). A eletromiografia (EMG) avaliou a atividade muscular dos gastrocnémios. Os resultados evidenciaram um aumento consistente da perfusão relacionado com a atividade proposta, sendo que foram encontrados valores maiores de CRBC no sexo masculino nas fases 2 e 3. Sugere-se que haja um seguimento deste estudo para continuar a sustentar o potencial deste modelo de avaliação na fisiologia e fisiopatologia da microcirculação.

Palavras chave: movimento e perfusão; microcirculação; volume de sangue; concentração de eritrócitos

Introduction

Cardiovascular pathology is differently expressed depending on many patient related determinants, including lifestyles, presence of major risk factors (e.g. diabetes) and sex [1-3]. Human microcirculatory adaptive response is known to be gender dependent [1]. Some studies recognized that males and females of the same species have different metabolic requirements [1,4] but, regarding movement, these studies did not address the importance of foot microcirculation in the gait process and the likely influence of the individual's gender on microvascular physiology. Walking is often referred to as the "sixth vital signal" associated with functional lifestyle and can be used as a rehabilitation instrument to activate the vascular multisystem in the lower limb. Sex related endocrine differences on endothelial function have been assessed [5]. Other studies addressed the relationship between microvascular dysfunction and cardiovascular events often linked to lifestyles based on sedentary habits and inactivity [6-7].

Dysfunctional walking was suggested to decrease gait quality, and consume approximately 40% more oxygen than normal (walking) individuals [8-10]. Therefore we aim to approach the impact of a basic movement like walking, mimicked by the "step in place" model, on the foot microcirculation.

Material and Methods

A convenience sample of fifteen healthy volunteers (24.5 ± 6.5 years old) both sexes, were selected (7 female and 8 male), with a BMI of 23.0 ± 2.6 and a normal ankle-brachial index (1.10 ± 0.14) corresponding to a normal peripheral circulatory physiology. All procedures were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and respective amendments, observing good clinical practice for medical research Involving human subjects [11].

All the experiments took place in the same room and after 10 minutes of acclimatization in standing. The applied protocol included three phases - one minute in a standing position (resting, Phase 1), one minute performing a step in place routine (Phase 2) and, one minute to recover standing in the same position as in Phase 1 (Phase 3). Local microcirculatory perfusion was quantified in both feet by light based systems, using wavelengths between 440 nm and 530 nm. Local changes in blood volume (BV) and pulse rate (PR)

Introdução

A expressão da patologia cardiovascular depende de diferentes indicadores clínicos relacionados com o paciente, incluindo o seu estilo de vida e a presença de importantes fatores de risco (por exemplo, diabetes) e de diferenças de resposta adaptativa dependentes do sexo [1-3]. Alguns estudos reconhecem que homens e mulheres têm requisitos metabólicos diferentes [1,4], contudo, em relação ao movimento, não é abordada a importância da microcirculação do pé no processo da marcha e a provável influência do sexo do indivíduo na fisiologia microvascular. A marcha é frequentemente referida como o "sexto sinal vital", associado ao estilo de vida funcional e pode ser utilizada como um instrumento de reabilitação para ativação do multi-sistema vascular no membro inferior. As diferenças endócrinas relacionadas ao sexo na função endotelial têm sido avaliadas [5], assim como outros estudos abordaram a relação entre disfunção microcirculatória e eventos cardiovasculares frequentemente associados a estilos de vida a hábitos sedentários e de inatividade [6-7]. A marcha disfuncional é uma marcha de qualidade reduzida com compensações que consomem ao indivíduo aproximadamente mais 40% de oxigénio do que aquela que é realizada em padrões normais [8-10]. Com base nestes pressupostos, este estudo pretende abordar o impacto de um movimento semelhante à marcha, mimetizado pelo modelo de "step in place", na microcirculação do pé.

Material e Métodos

Foram selecionados quinze voluntários saudáveis (24,5 ± 6,5 anos de idade) de ambos os sexos (7 do sexo feminino e 8 do masculino), com Índice de Massa Corporal (IMC) de 23,0 ± 2,6 e Índice Tornozelo-Braço normal (1,10 ± 0,14), correspondendo a uma fisiologia circulatória periférica normal. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsínquia e respetivas alterações, observando as boas práticas clínicas para pesquisas médicas que envolvem seres humanos [11].

Todas as experiências ocorreram na mesma sala e após 10 minutos na posição de pé para aclimação. O protocolo utilizado incluiu 3 fases - um minuto na posição de pé (repouso, fase 1), um minuto realizando a rotina de passos no mesmo local (fase 2) e, um minuto de recuperação na mesma posição da fase 1 (fase 3). A perfusão microcirculatória local foi quantificada em ambos os pés por sistemas baseados em luz, usando comprimentos de onda entre 440 nm e 530 nm. As alterações

were measured through a reflection Photoplethysmography (PPG) sensor placed 1 cm proximal from the 1st metatarsus phalangeal joint. The concentration of red blood cells (CRBC) was assessed with the Tissue Viability Image system (WheelsBridge, SE) by a portable probe placed as near as possible to the PPG sensor and analysed with the TiVi Wheels Bridge Software. Additionally, to assess the electrical activity contribution of the muscle pump, the surface Electromyography (EMG) was applied to the gastrocnemius muscle. Both PPG sensor and EMG electrodes were attached to a BI-Talino plugged microprocessor board (PLUX Wireless Biosignals, Portugal), and analysed with MatLab [12]. The blood volume was calculated with PPG signals and expressed as the mean waveform amplitude (arbitrary units – AU). Pulse rate was identified as the number of waveforms per minute (/min). The EMG was expressed as the ratio of the root mean square (rms) of second and third phases, relative to the Phase 1. The Wilcoxon signed-rank test was used for phase comparisons for each variable and the Mann-Whitney test was used for sex comparison within the same phase. A $p > 0.05$ significance level was adopted.

Results and Discussion

Results are presented in Table 1 and for blood volume values, no significant difference between sexes ($p=0.336$) could be detected in Phase 1 meaning all volunteers were equivalent in terms of their microcirculatory perfusion baseline. When we compared means of Phase 1 with Phase 3, significant increases in blood perfusion ($p=0.002$) and pulse rate were found for all subjects, again no difference between sexes. These results do not meet the gender dependence of perfusion described and also in accordance with our own experience [13-16]. Nevertheless, we should note that all these measurements were performed in the standing position, while in the other studies, measurements were taken seated or in supine.

Perfusion measured by PPG was not possible to obtain in Phase 2, as the foot impact on the floor created many artefacts. In turn, variations found in gastrocnemius contraction during all three phases (Figure 1) were expected and, were analysed in relation to the microcirculation variations (see below).

To calculate the mean TiVi index in the same area, obtaining the subsequent images, a region of interest (ROI) was selected and analysed. For CRBC during phase 1 (baseline data) (Figure 1), we found no sex-

locais no volume sanguíneo (VS) e na taxa de pulso (FP) foram medidas através de um sensor de fotoplethysmografia de reflexão (FPG) posicionado a 1 cm proximal da 1ª articulação metatarso-falângica. A concentração de glóbulos vermelhos (CGVS) foi avaliada com o sistema Tissue Viability Image (WheelsBridge, SE) utilizando uma sonda portátil colocada o mais próximo possível do sensor FPG e os dados analisados com o TiVi Wheels Bridge Software. Para avaliar a contribuição da atividade elétrica da bomba muscular, a eletromiografia de superfície (EMG) foi aplicada ao músculo gastrocnémio. O sensor FPG e os elétrodos EMG foram conectados a uma placa de microprocessador da BI-Talino (PLUX Wireless Biosignals, Portugal) e analisados com o sistema MatLab [12]. O volume sanguíneo foi calculado com sinais PPG e expresso como a amplitude média da forma de onda (unidades arbitrárias - AU).

A frequência de pulso foi identificada como o número de ondas por minuto (/min). O EMG foi expresso como a razão entre o quadrado médio da raiz (rms) da segunda e terceira fases, em relação à fase 1. O teste de postos sinalizados de Wilcoxon foi usado para cada variável na comparação entre fases e o teste de Mann-Whitney para a comparação entre valores de cada sexo na mesma fase. Foi adotado o nível de significância $p > 0,05$.

Resultados e Discussão

Nos resultados apresentados na tabela 1 podemos verificar que nos valores de volume sanguíneo (FPG) não foram observadas diferenças significativas entre os dois sexos ($p = 0,336$) na fase 1, o que significa que todos os voluntários foram equivalentes em termos de linha de base de perfusão microcirculatória. Quando comparadas as médias da fase 1 com a fase 3, foram encontrados aumentos significativos no volume sanguíneo ($p = 0,002$) e na frequência de pulso para todos os indivíduos, novamente sem diferença entre os sexos. Estes resultados não atendem à dependência de perfusão de gênero descrita noutras experiências [13-16]. No entanto, devemos salientar que neste estudo, todas essas medidas foram realizadas na posição de pé, enquanto nos demais estudos as medidas foram realizadas na posição de sentado ou em decúbito dorsal, o que pode dar origem a esta divergência. Não foi possível obter a perfusão medida pelo FPG na fase 2, uma vez que o impacto do pé no chão criou muitos artefactos. Por sua vez, as variações encontradas na contração do gastrocnémio durante todas as três fases (Figure 1) eram esperadas e foram analisadas em relação às variações da microcirculação (veja em parágrafo abaixo).

Para calcular a média do índice de TiVi na mesma área,

related differences ($p=0.189$). A significant decrease of mean CRBC (TiVi-mean index) was detected when comparing Phase 1 and 2, with values consistently higher in male ($p=0.009$). A similar significant decrease between Phase 1 and 3 was detected for CRBC values ($p=0.004$). As published previously, light exercise seems to lower the submaximal blood flow after a period of training [5]. A significant increase in EMG gastrocnemius activity ($p=0.001$) was detected during Phase 2, but no sex-related differences are found (Table 1). Variations on the lower limb microcirculation might be related to the main driving force of the peripheral circulation determined by the calf muscle pump, as previously suggested [5,10,17].

Comparing CRBC values from Phase 1 and Phase 3 still shows significant higher differences for male ($p=0.029$) affecting all means ($p=0.036$), suggesting a quick recovery with higher values in Phase 3. Comparing the EMG values between Phases 1 and 3 we find that the muscle is still activated, suggesting same muscle activity in the recovery phase that can influence the microcirculation. The calf muscle, the gastrocnemius in particular, is important for the lower limb microcirculation homeostasis triggering a complex regulatory feedforward mechanism that changes local blood flow according with task [18-20].

Our results suggest that this simple task can induce a similar effect to walking, and for that it might be also interesting as a rehabilitation exercise. Nevertheless, further studies are necessary to confirm some of the views here expressed, including to increase the “n”, to compare results in different positions, and to compare healthy individuals with different pathophysiological characteristics.

foi selecionada e analisada uma região de interesse (ROI) em todas as imagens subsequentes. Para CGVS durante a fase 1 (dados de base iniciais) (Figura 1), não foram encontradas diferenças relacionadas ao sexo ($p = 0,189$). Uma diminuição significativa dos valores médios dos CGVS (índice médio de TiVi) foi detetado, quando comparadas as fases 1 e 2, com valores consistentemente mais altos no sexo masculino ($p = 0,009$). Uma diminuição significativa semelhante entre as fases 1 e 3 foi verificada para os valores de CGVS ($p = 0,004$). Conforme publicado anteriormente, o exercício ligeiro parece diminuir o fluxo sanguíneo submáximo após um período de treino [5]. Um aumento significativo na atividade dos gastrocnémios foi detetado com EMG durante a fase 2 ($p = 0,001$), mas não foram encontradas diferenças relacionadas com o sexo (Tabela 1). Variações na microcirculação do membro inferior podem estar relacionadas à principal força motriz da circulação periférica determinada pela bomba muscular da região posterior da perna, como sugerido anteriormente [5,10,17].

A comparação dos valores de CGVS entre as fase 1 e 3 mostra também diferenças significativamente maiores no sexo masculino ($p = 0,029$), afetando todas as médias ($p = 0,036$) e sugerindo uma rápida recuperação com valores mais altos na fase 3. Comparando os valores EMG entre as fases 1 e 3 identificámos que o músculo se mantém significativamente ativo, o que sugere que, a manutenção da atividade muscular na fase de recuperação pode ainda estar a influenciar a microcirculação. Os músculos da bomba muscular periférica, em particular os gastrocnémios, são importante para a homeostasia da microcirculação dos membros inferiores, desencadeando um complexo mecanismo regulador de feedforward que influencia o fluxo sanguíneo local de acordo com a tarefa [18-20].

Os resultados deste estudo sugerem que uma tarefa simples pode induzir um efeito semelhante à marcha e, por isso, também pode ser interessante como exercício de reabilitação. No entanto, novos estudos são necessários para confirmar algumas das opiniões aqui expressas, o que inclui aumentar o “n”, comparar resultados em diferentes posturas e comparar indivíduos saudáveis com diferentes características fisiopatológicas.

Table 1 / Tabela 1 - Mean and standard deviation of the PPG amplitude and ratios and the EMG recorded in each phase of the protocol (F= female; M= Male; F+M= female+male; * $p < 0.05$). / Média e desvio padrão da amplitude da FPG e rários, EMG, registados em cada fase do protocolo (F= feminino; M= Masculino; F+M= feminine+masculino; * $p < 0.05$).

Sex / Sexo F(n=5) M (n=6)		Phase / Fase 1			Phase / Fase 2			Phase / Fase 3		
		F	M	F+M	F	M	F+M	F	M	F+M
PPG(AU) / FPG (UA)	mean / média	22	23	22,5	N/A			27,3	27,0	27,1
	sd / dp	1,38	4,88	3,13	N/A			6,1	5,1	5,6
	p	0.336		-	N/A			0.536		0.002*
CRBC (AU) / CCVS (UA)	mean / média	247,2	299,4	273,3	225,2	284,3	254,7	230,1	294,0	262,0
	sd / dp	17,3	66,07	41,7	11,7	52,6	32,1	16,12	66,7	66,69
	p	0.189		-	0.009*		0.004*	0.029*		0.036*
PR / FP (/min)	mean / média	74	65,6	69,8	N/A			76,1	71,1	73,6
	sd / dp	3.32	10,05	10,05	N/A			2,96	11,95	7,46
	p	0.014*		-	N/A			0.463		0.001*
EMG (rms) ratio	mean / média	1	1	1	1,95	2,83	2,39	1,21	1,58	1,40
	sd / dp	0	0	0	0,52	1,60	1,06	0,33	0,66	0,50
	p	1		-	0.463		0.001*	0.152		0.001*

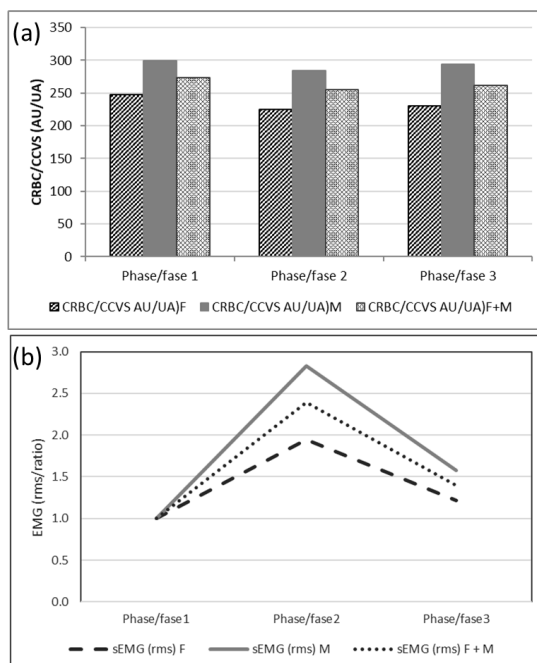


Figure 1/ Figura 1 - Comparison of CRBC values (a) and EMG ratio (b) between sexes and between total averages during the three phases of the protocol (F= female; M= Male; F+M= female+male; * $p < 0.05$).

Comparação dos valores de CGVS (a) e ratio de EMG (b) entre sexos e entre a média total durante as três fases do protocolo (F= feminino; M= Masculino; F+M= feminine+masculino; * $p < 0.05$).

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to all the volunteers for their participation in this study. This work was supported by national funds from FCT, within the project UID/DTP/04567/2019.

Conflict of Interests

All authors declared no conflict of interests.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos a todos os voluntários por sua participação neste estudo. Este trabalho foi apoiado por fundos nacionais da FCT, dentro do projeto UID/DTP/04567/2019.

Conflito de Interesses

Os autores não declararam qualquer conflito de interesses

References /Referências

1. Kao WL, Sun CW. Gender-Related Effect in Oxygenation Dynamics by Using Far-Infrared Intervention with Near-Infrared Spectroscopy Measurement: A Gender Differences Controlled Trial. *PLoS ONE* 2015; 10(11): e0135166. doi:10.1371/journal.pone.0135166
2. Margaryants NB, Sidorov IS, Volkov MV, Gurov IP, Mamontov OV, Kamshilin AA. Visualization of skin capillaries with moving red blood cells in arbitrary area of the body. Vol. 10, No. 9 / 1 September 2019 / *Biomedical Optics Express* 4896. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004896>
3. Sara JD, Taher R, Kolluri N, Vella A, Lerman LO, Lerman A. Coronary microvascular dysfunction is associated with poor glycemic control amongst female diabetics with chest pain and non-obstructive coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol* (2019) 18:22. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0833-1>
4. Huxley VH, Kem SS. Sex-Specific Characteristics of the Microcirculation. *Adv Exp Med Biol.* 2018 ; 1065: 307–328. doi:10.1007/978-3-319-77932-4_20.
5. Glieman L, Hansen CV, Rytter N, Hellsten Y. Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. *Current Opinion in Physiology* 2019, 10:146–155 <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.05.001>
6. Leopold JA. Microvascular Dysfunction: Genetic Polymorphisms Suggest Sex-Specific Differences in Disease Phenotype. *Coron Artery Dis.* 2014 June; 25(4): 275–276. doi:10.1097/MCA.000000000000122.
7. Vranish JR, Young BE, Stephens BY, Kaur J, Padilla Jaume, Fadel PJ. Brief periods of inactivity reduce leg microvascular, but not macrovascular, function in healthy young men. *Experimental Physiology.* 2018;103:1425–1434. DOI: 10.1113/EP086918
8. McGowan CP, Neptune RR, Clark DJ, Kautz SA. Modular control of human walking: Adaptations to altered mechanical demands. *Journal of biomechanics.* 2010 Feb 10;43(3):412-9
9. Truijten J, Kim YS, Krediet CTP, Stok WJ, Ko 1gen RS, Secher NH, van Lieshout JJ. Orthostatic leg blood volume changes assessed by near-infrared spectroscopy. *Exp Physiol* 97.3 (2012) pp 353–361. DOI: 10.1113/expphysiol.2011.061051.
10. Caldwell J, Wardlow G, Branch P, Ramos M, Black C, Ade C. Effect of exercise-induced muscle damage on vascular function and skeletal muscle microvascular deoxygenation. *Physiol Reports*, 2016,4 (22), e13032.
11. World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310, 2191–2194, <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053> (2013).
12. Vest AN, Poian GD, Li Q, Liu C, Nemati S, Shah AJ, Clifford GD. An Open Source Benchmarked Toolbox for Cardiovascular Waveform and Interval Analysis. *Physiol Meas*; 39(10): 105004. doi:10.1088/1361-6579/aae021.
13. McDermott MM, Fried L, Simonsick E, Ling S, Guralnik JM. Asymptomatic peripheral arterial disease is independently associated with impaired lower extremity functioning: the women’s health and aging study. *Circulation.* 2000; 101:1007–1012.
14. Silva, H., Bento, M., Vieira, H. & Rodrigues, L. M. Comparing the spectral components of laser Doppler flowmetry and photoplethysmography signals for the assessment of the vascular response to hyperoxia. *Biomed Biopharm Res.* (14) 2, 187–194. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.2.161> (2017).
15. Silva, H., Ferreira, H. A., da Silva, H. P. & Rodrigues, L. M. The Venoarteriolar Reflex Significantly Reduces Contralateral Perfusion as Part of the Lower Limb Circulatory Homeostasis in vivo. *Front Physiol.* 9, 1123, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01123> (2018).
16. Rocha, C., Macedo, A., Nuno, S., Silva, H., Ferreira, H. & Rodrigues, L. M. Exploring the perfusion modifications occurring with massage in the human lower limbs by non-contact polarized spectroscopy. *Biomed Biopharm Res.* , 2018; (15) 2: , 196-204. DOI: 10.19277/bbr.15.2.186
17. Recek C. Calf pump activity influencing venous hemodynamics in the lower extremity. *Int J Angiol.* 2013 Mar; 22(1):23-30.
18. Tschakovsky ME, Matusiak K, Vipond C, McVicar L. Lower limb-localized vascular phenomena explain initial orthostatic hypotension up on standing from squat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov; 301(5):H2102-12. doi: 10.1152/ajpheart.00571.2011.
19. Florindo M, Silva H, Monteiro Rodrigues. Impact of the isometric contraction of the calf on the local microcirculation *Biomedical Sciences/Ciências Biomédicas Biomed Biopharm Res.* 2017; (14) 2: 179-186. DOI: 10.19277/bbr.14.2.160
20. Sinkler SY, Segal SS. Rapid versus slow ascending vasodilatation: intercellular conduction versus flow-mediated signalling with tetanic versus rhythmic muscle contractions. *J Physiol* 595.23 (2017) pp 7149–7165. DOI: 10.1113/JP275186

Safety signals assessed by the pharmacovigilance risk assesement committee: biologics vs conventional medicines

*Sinais de Segurança analisados pelo comité de avaliação do risco em farmacovigilância:
biológicos vs terapêutica convencional*

Margarida Estudante, Teresa Lopes, Dinah Duarte

CBIOS – Universidade Lusófona' Centro de Pesquisa de Ciências e Tecnologias da Saúde, Campo Grande, 376, 1749-024,
Lisboa, Portugal

Email: margarida.estudante@ulusofona.pt

Abstract

The Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) is responsible for medicines safety monitoring in Europe. Biologic drugs (BDs) have more recently been developed and reinforced the treatment of serious and chronic diseases. Because of their specificities, BDs have become a new challenge for pharmacovigilance. This work evaluates safety signals generated by PRAC for BDs vs. conventional therapy (CT) between September 2012 and December 2018 (819 signals). Normalizing the results by the number of molecules (INN) in each drug class we found the proportion of safety signals by therapy type to be 4 for BDs vs. 2.5 for CT. The System Organ Classes (SOCs) affected by safety signals triggered for BDs and CT were compared. The three most relevant System Organ Classes (SOCs) found to be related to CT signals are general disorders and administration site conditions (14%), skin and subcutaneous tissue disorders (7%) and gastrointestinal disorders (6%). Signals related to BDs are mainly associated with blood and lymphatic system disorders (14%), skin and subcutaneous tissue disorders (13%) and nervous system disorders (10%). During the study period safety signals for BDs were proportionally 1.6 higher than safety signals for CT.

Keywords: Conventional therapy; biologics; safety signals; PRAC; pharmacovigilance

Resumo

O Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) monitoriza a segurança dos medicamentos na Europa. Os medicamentos biológicos (MBs) reforçaram o tratamento de doenças graves e crónicas, mas, devido às suas especificidades, tornaram-se num desafio para a farmacovigilância. Este trabalho avalia os sinais de segurança gerados pelo PRAC para MBs vs. medicamentos tradicionais (MTs) entre setembro de 2012 e dezembro de 2018 (819 sinais). Considerando o número de moléculas (DCI) em cada classe de medicamentos, obteve-se a proporção de sinais de segurança por tipo de terapêutica: 4 para MBs vs. 2,5 para MTs. Foram comparadas as Classes de Sistemas e Órgãos (SOCs) afetadas pelos sinais de segurança gerados por MBs e MTs. As principais SOCs associadas aos sinais dos MTs são perturbações gerais e condições no local de administração (14%), distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos (7%) e doenças gastrointestinais (6%). Para os MBs, os sinais estão principalmente relacionados com doenças do sangue e do sistema linfático (14%), distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos (13%) e do sistema nervoso (10%). Durante o período do estudo, os sinais de segurança para MBs foram proporcionalmente 1,6 mais elevados do que os gerados para os MTs.

Palavras-Chave: Medicamentos tradicionais; biológicos; sinais de segurança; PRAC; farmacovigilância

Introduction

All medicines are likely to cause adverse drug reactions (ADRs). Pharmacovigilance began about 170 years ago, not being recognized as such at that time (1, 2). Safety monitoring for all medicines throughout their lifecycles is now a regulatory requirement in order to protect public health. Pharmacovigilance methodology and regulations constitute a constant challenge as new scientific discoveries evolve (3). Since thalidomide tragedy (4) and the emergence of the first Pharmacovigilance Systems, there has been a constant evolution in the access and data processing of medicines' safety data (5).

Another important milestone occurred in 2010, with the publication of new European pharmacovigilance legislation aiming to join efforts between all Member States and the Marketing Authorisation Holders (MAHs). This new legislation focuses in the constitution of a Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) within the European Medicines Agency (EMA). The PRAC was formally established in July 2012 and finalized its constitution in the spring 2013 with the appointment of patient and health-care professional organization representatives as full voting members. The Committee includes independent experts in pharmacoepidemiology, clinical pharmacology, biologics, signal detection, risk communication, and vaccine vigilance (6).

This committee proactively monitors all aspects related to the safety of marketed medicines, including signal evaluation and management of post-marketing benefit-risk assessments (7).

The new pharmacovigilance legislation led to the development of a set of guidelines by the EMA on good pharmacovigilance practices (GVPs) (8), and endorsed the creation of an European (EU) database, the EudraVigilance database. Eudravigilance is an EU centralized system for recording and analyzing ADRs occurred with medicines with marketing authorization in Europe, and is a main resource for safety signal detection (5). Evaluation of generated signals requires a scientific based approach in order to prioritize and manage new information. The PRAC is responsible for this task, including updating product information and restrictions for use, among other recommendations (6). Signal detection and evaluation are essential elements of current pharmacovigilance, having been extensively studied during the last few years, throughout different European projects, in order to define good signal detection practices (9-11). EMA's GVP Module IX-Signal management (12) describes the process of signal detection and validation within the EU.

A safety signal can be originated by several sources, in-

Introdução

Todos os medicamentos são suscetíveis de causar reações adversas (RAMs). A farmacovigilância teve início há cerca de 170 anos, não sendo reconhecida como tal na época (1, 2). A monitorização da segurança dos medicamentos ao longo do seu ciclo de vida é atualmente um requisito regulamentar como medida de proteção da saúde pública. As metodologias e regulamentação em farmacovigilância requerem uma revisão constante à medida que surgem novos avanços científicos (3). Desde a tragédia da talidomida (4) e a implementação dos primeiros Sistemas de Farmacovigilância, tem havido uma evolução constante no acesso e processamento de dados de segurança (5).

Outro marco importante ocorreu em 2010, com a publicação de nova legislação europeia (EU) em sobre farmacovigilância, destinada a unir esforços entre todos os Estados-Membros e os titulares de Autorização de Introdução no Mercado (TAIM). Esta nova legislação centra-se na constituição de um Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) sediado na Agência Europeia do Medicamento (EMA). O PRAC foi formalmente estabelecido em julho de 2012 e finalizou a sua constituição na primavera de 2013 com a nomeação de representantes das organizações de profissionais de saúde e doentes, como membros votantes plenos. O Comité inclui peritos independentes em pharmacoepidemiologia, farmacologia clínica, biologia, deteção de sinais, comunicação de riscos e vigilância de vacinas (6).

Este Comité assegura proativamente todos os aspetos relacionados com a segurança dos medicamentos comercializados, incluindo a avaliação do sinal e o planeamento e gestão das avaliações de risco pós-comercialização (7).

A nova legislação de farmacovigilância deu origem a um conjunto de normas orientadores da EMA em boas praticas de farmacovigilância (GVPs) (8) e determinou a criação de uma base de dados Europeia (EU), a base de dados EudraVigilance. Trata-se de uma base de dados centralizada na UE para o registo e análise de RAMs relacionados com medicamentos com autorização de comercialização, constituindo um recurso fundamental para a deteção de sinais de segurança (5). A avaliação do sinal gerado requer uma abordagem científica para priorizar e gerir as novas informações. O PRAC é responsável por essa tarefa, incluindo atualização de informações sobre medicamentos, restrições de utilização, entre outras recomendações (6). A deteção e a avaliação de sinais são elementos essenciais da farmacovigilância atual, tendo sido amplamente estudadas durante os

cluding observational and/or experimental studies. An important source of signals in drug safety is the spontaneous reporting system, which relies on the reporting of ADRs by health-care professionals and consumers to National Competent Authorities or pharmaceutical companies (13).

A signal can be related to information about a new and unknown potentially causal association, or a novel aspect of an already known association between events that requires further investigation. Differences in frequency, duration, severity, or outcome of a known association should be analyzed (12). PRAC results regarding signals identified through the regulatory European network have been subject of several publications (14, 9, 15). This study compares the pattern of safety signals generated and published by PRAC for medicines obtained through biological sources (biological medicines or biologics) and conventional medicines over a defined time period (September 2012 to December 2018).

Conventional medicines are understood as the use of drugs containing small molecules with pharmacological activity, obtained by chemical synthesis. Conventional medicines are currently the main therapeutic resource (16). Biological medicines are complex drugs produced by living organisms and have limited utilization experience, having only been launched in the 1980's (17). Biologics are macromolecules larger in size than synthetic small molecule drugs, require more resources for production, and have a higher cost. The development of biologics led to the treatment improvement of several serious and chronic diseases such as cancer, autoimmune conditions, diabetes, and anemia (18-21).

Knowledge about the safety profile of new drugs is not complete at the time of approval (Marketing Authorization – MA), primarily due to intrinsic limitations of clinical trials, among other reasons. Furthermore, during the pre-approval phase, safety profile assessment is more difficult for biologics than for chemically synthesized molecules because of limited predictability of animal studies and a high immunogenicity potential. Post-marketing safety data is therefore essential to evaluate new potential safety concerns in clinical practice. Moreover, the biologics manufacturing or formulating process may change over time (22).

Based on the different features and marketing experience of biologics in comparison to conventional medicines, we defined the primary objective of this work as a preliminary comparison of the safety signals pattern generated for biological medicines against the safety signals generated for conventional medicines, from

últimos anos por meio de diferentes projetos europeus, de modo a estabelecer boas práticas na detecção do sinal (9-11). A norma orientadora da EMA “GVP-Module IX-Signal management” (12) descreve o processo de detecção e validação do sinal a nível europeu.

Um sinal de segurança pode ter origem em várias fontes, incluindo estudos observacionais e/ ou experimentais. Uma importante fonte de sinais em matéria de segurança dos medicamentos é o sistema de notificação espontânea, que se baseia na comunicação de RAMs pelos profissionais de saúde e doentes, às Autoridades Nacionais Competentes ou às empresas pertencentes ao circuito do medicamento (13).

Um sinal consiste em informação que sugere uma nova associação potencialmente causal ou um aspeto novo de uma associação já conhecida, que requerem uma investigação mais aprofundada. As diferenças na frequência, duração, gravidade ou resultados de associações conhecidas devem ser analisados (12). Os sinais identificados pelo PRAC através da rede de farmacovigilância europeia têm sido alvo de várias publicações (14, 9, 15). Este estudo compara o padrão de sinais de segurança gerados e publicados pelo PRAC para medicamentos obtidos por meios biológicos (medicamentos biológicos) e medicamentos convencionais num período de tempo definido (setembro de 2012 a dezembro de 2018).

Os medicamentos convencionais têm como substância ativa pequenas moléculas com atividade farmacológica, obtidas por síntese química e constituem o principal recurso terapêutico atual (16). Os medicamentos biológicos são constituídos por complexas, produzidos por organismos vivos e cuja experiência de utilização é limitada, tendo a sua comercialização iniciado apenas na década de 1980 (17). Os medicamentos biológicos são macromoléculas de dimensões superiores às das pequenas moléculas sintéticas, exigem mais recursos na produção e são mais caros. O desenvolvimento de medicamentos biológicos melhorou o tratamento de muitas doenças graves e crónicas, como o cancro, doenças autoimunes, diabetes e anemia (18-21).

O conhecimento sobre o perfil de segurança de novos medicamentos não está completo aquando do momento da aprovação (Autorização de introdução no mercado - AIM), devido às limitações intrínsecas dos ensaios clínicos, entre outras razões. Também durante a fase de pré-aprovação, a avaliação do perfil de segurança é mais difícil para os medicamentos biológicos do que para as moléculas quimicamente sintetizadas, devido à limitada previsibilidade dos estudos em animais e a um elevado potencial de imunogenicidade. Os dados de segurança pós-comercialização tornam-se assim es-

available data (September 2012 to December 2018). To this end, we defined as secondary objectives:

- the comparison of the means of signals frequencies in the biologics group and conventional medicines group;
- the comparison of the three most relevant System Organ Classes (SOC) affected by the signal in the two study samples;
- the computation of the relative risk (RR) of biologics vs. conventional medicines by SOC.

Material and Methods

This study is designed as an observational retrospective longitudinal study. Data on the variable under analysis (safety signals generated and published by the PRAC from September 2012 to December 2018) was obtained by consulting the “List of safety signals discussed since September 2012” available at the EMA website (23). The safety signals generated and published by the PRAC were selected as the study variable due to their reliability on bringing new information on medicinal safety, resulting from the analysis of a large European ADR database (Eudravigilance) with validation by an expert committee (PRAC) (14). Other important factors associated with the selection of this variable were its open access and regular update, allowing study continuity (23).

Number of signals published by PRAC for biologics compared to conventional medicines

In order to assess differences in the means of signals published by the PRAC for biological medicines compared to conventional medicines, we used the Mann-Whitney nonparametric test for two independent samples with a confidence level of 95%. The similarity of the distributions of the two samples was confirmed by the Levene test. Statistical treatment was performed using IBM SPSS 2019 software.

senciais para avaliar potenciais riscos de segurança na prática clínica. Adicionalmente, o processo de fabrico ou formulação de produtos biológicos pode alterar-se ao longo do tempo (22).

Tendo por base as especificidades e experiência de comercialização dos medicamentos biológicos relativamente aos medicamentos convencionais, definimos como objetivo primário deste trabalho a comparação preliminar do padrão de sinais de segurança gerados para medicamentos biológicos com o padrão de sinais de segurança gerados para medicamentos convencionais. Foram definidos os seguintes objetivos secundários:

- comparação das médias das frequências dos sinais na amostra de medicamentos biológicos e na amostra de medicamentos convencionais;
- comparação das 3 Classes de Órgãos e Sistemas (SOC) afetadas pelo sinal mais relevantes nas duas amostras em estudo;
- cálculo do risco relativo (RR) dos medicamentos biológicos vs. medicamentos convencionais por SOC.

Material e Métodos

Este trabalho está desenhado como estudo observacional retrospectivo longitudinal.

Os dados sobre a variável em análise (sinais de segurança gerados e publicados pelo PRAC de setembro de 2012 até dezembro de 2018) foram obtidos por consulta da “List of safety signals discussed since September 2012” disponível no sítio eletrónico da EMA (23). Os sinais de segurança gerados e publicados pelo PRAC foram selecionados como variável de estudo devido à sua robustez na informação de segurança sobre medicamentos, sendo resultantes da análise de uma grande base de dados europeia de RAMs (Eudravigilance) e avaliados por um comité de peritos (PRAC) (14). Outro fator importante na seleção desta variável foi o seu livre acesso e atualização regular, viabilizando a continuidade do estudo (23).

Número de sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos comparativamente aos medicamentos tradicionais

De forma a avaliar diferenças nas médias dos sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos comparativamente aos medicamentos tradicionais foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para 2 amostras independentes, com um nível de confiança de 95%. A semelhança das distribuições das 2 amostras foi comprovada pelo teste de Levene. O tra-

Comparison of SOC associated with signals published by PRAC for biologics and conventional medicines

In order to evaluate potential differences in the distribution of signals generated by System and Organ Classes (SOCs) affected by the signal, we calculated the Relative Risk (RR) by SOC for biologics in relation to conventional medicines (RR = relative frequency of biological medicines signal by SOC / relative frequency of conventional medicines signal by SOC (24, 25). The relative frequency of the signal per SOC for each drug class is given by the total signals in a given SOC in the drug class / total signals in the drug class.

If RR is greater than 1, the relative risk of generating a signal in that SOC category is higher for the biological medicines than for the conventional medicines.

Results

Number of signals published by PRAC for biologics compared to conventional medicines

A total of 819 signals were generated by the PRAC from September 2012 to December 2018. Of these, 175 (21.37%) originated from biological medicines and 644 (78.63%) from conventional medicines. The number of molecules analyzed by the PRAC during the study period was different for each class of drugs: 42 molecules for biologics vs. 255 molecules for conventional medicines, therefore the sample size for conventional medicines was six times larger than the sample for biological medicines. The frequency mean of signals published in the biological medicines sample was 4.17 compared to a mean of 2.52 for conventional medicines, with statistical significant difference ($p < 0.05$). Regarding the frequency of published signals per year of study, no sta-

tamento estatístico foi efetuado no software IBM SPSS Statistics 2019.

Comparação das SOC associadas aos sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos e medicamentos tradicionais

De forma a aprofundar eventuais diferenças na distribuio dos sinais gerados por Classes de Sistemas e  rg os (SOC) afetadas pelo sinal, calculámos o Risco Relativo (RR) por SOC para os medicamentos biológicos vs. a terapêutica convencional (RR= frequência relativa de sinal biológico por SOC/ frequência relativa de sinal da terapêutica convencional por SOC) (24, 25). A frequência relativa do sinal por SOC para cada classe de medicamentos é dada pelo total de sinais nessa SOC nessa classe de medicamentos/ total de sinais nessa classe de medicamentos.

Resultados

Número de sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos comparativamente aos medicamentos tradicionais

Foram gerados pelo PRAC um total de 819 sinais de setembro de 2012 até dezembro de 2018. Dos mesmos, 175 (21,37%) têm origem em medicamentos biológicos e 644 (78,63%) em medicamentos convencionais. O número de moléculas analisadas pelo PRAC no período observado pelo estudo é diferente para cada classe de medicamentos: 42 moléculas para biológicos vs. 255 moléculas para medicamentos convencionais, logo a dimensão da amostra para medicamentos convencionais   seis vezes superior   da amostra de medicamentos biológicos. A média da frequência de sinais publicados na amostra de medicamentos biológicos é de 4,17 comparativamente a uma média de 2,52 para medicamentos convencionais ($p < 0,05$). Relativamente à frequência de sinais publicados por ano de estudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,5$) (Tabela 1).

Table 1 / Tabela 1 - Signal distribution (absolute frequency, percentage and mean) by year and type of medicine (September 2012 until June 2018) / Distribuição de sinais (frequência absoluta, percentagem e média) por ano e tipo de medicamento (setembro de 2012 até junho de 2018). * $p < 0.05$

Year/ Ano	Biologics / Biológicos (n=42)	Conventional/ Convencional (n=255)
September until December 2012/ setembro até dezembro de 2012	8 (5%)	38 (6%)
2013	26 (15%)	97 (15%)
2014	18 (10%)	99 (15%)
2015	39 (22%)	102 (16%)
2016	28 (16%)	103 (16%)
2017	16 (9%)	100 (16%)
January until June 2018/ janeiro a junho de 2018	40 (16%)	105 (16%)
Total/ Total	175 (100%)	644 (100%)
Mean / Média	4.17* (=175/42)	2.52 (=644/255)

tistically significant differences were observed between the two samples ($p > 0.05$) (Table 1).

Comparison of SOC's associated with signals published by PRAC for biologics and conventional medicines

The results of our study show that the three most relevant System Organ Classes (SOCs) found to be related to traditional medicines signals were general disorders and administration site conditions (14.29%), skin and subcutaneous tissue disorders (7.45%) and gastrointestinal disorders (6.21%). Regarding to biological medicines, signals were mainly related to blood and lymphatic system disorders (13.71%), skin and subcutaneous tissue disorders (13.14%) and nervous system disorders (10.29%) SOC's (Table 2). Results related to the computed RR are presented in Table 2 and discussed with more detail in the next section.

Comparação das SOC associadas aos sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos e medicamentos tradicionais

De acordo com os resultados do estudo, as principais SOC's relacionadas com os sinais dos medicamentos tradicionais são perturbações gerais e condições no local de administração (14,29%; inclui interações medicamentosas, entre outras), distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos (7,45%) e doenças gastrointestinais (6,21%). No que diz respeito aos medicamentos biológicos, os sinais estão principalmente relacionados com SOC relacionadas com doenças do sangue e do sistema linfático (13,71%), distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos (13,14%) e do sistema nervoso (10,29%) (Tabela 2). Foi ainda avaliado o Risco Relativo (RR) por SOC dos sinais pelo PRAC para medicamentos biológicos em comparação com os convencionais, cujos resultados se encontram na Tabela 2 e serão discutidos na próxima seção.

Table 2 / Tabela 2 – Relative Risk (RR) by System Organ Class Classification (SOC) of signals raised by PRAC for biological medicines in comparison to conventional medicines. **not applicable / Risco Relativo (RR) por Classificação Sistema Órgão Classe (SOC) de sinais gerados pelo PRAC para medicamentos biológicos em comparação com convencionais. **não aplicável.

System Organ Class Classification (SOC) / Classificação Sistema Órgão Classe (SOC)	Biologics / Biológico Total%	Conventional / Convencional Total %	RR Biologics vs Conventional / RR Biológico vs Convencional
Blood and lymphatic system disorders / Doenças do sangue e do sistema linfático	24 (13.71)	26 (4.04)	3.4
Cardiac disorders / Cardiopatias	5 (2.86)	36 (5.59)	0.51
Congenital, familial and genetic disorders/ Afeções congénitas, familiares e genéticas	0 (0.00)	9 (1.40)	0
Ear and labyrinth disorders / Afeções do ouvido e do labirinto	3 (1.71)	2 (0.31)	5.52
Endocrine disorders / Doenças endócrinas	3 (1.71)	17 (2.64)	0.65
Eye disorders / Afeções oculares	4 (2.29)	24 (3.73)	0.61
Gastrointestinal disorders / Doenças gastrointestinais	8 (4.57)	40 (6.21)	0.74
General disorders and administration site conditions / Perturbações gerais e alterações no local de administração	7 (4.00)	92 (14.29)	0.28
Hepatobiliary disorders / Afeções hepáticas e hepatobiliares	1 (0.57)	14 (2.17)	0.26
Immune system disorders / Doenças do sistema imunitário	10 (5.71)	16 (2.48)	2.3
Infections and infestations / Infecções e infestações	14 (8.00)	15 (2.33)	3.43
Injury, poisoning and procedural complications / Complicações de intervenções relacionadas com lesões e intoxicações	1 (0.57)	24 (3.73)	0.15
Investigatory exams / Exames complementares de diagnóstico	2 (1.14)	22 (3.42)	0.33
Metabolism and nutrition disorders / Doenças do metabolismo e da nutrição	4 (2.29)	32 (4.97)	0.46
Musculoskeletal and connective tissue disorders / Doenças musculoesqueléticas e dos tecidos conjuntivos	4 (2.29)	28 (4.35)	0.53
Neoplasms benign, malignant and unspecified (incl. cysts and polyps) / Neoplasias benignas, malignas e não especificadas (incl. quistos e polipos)	9 (5.14)	23 (3.57)	1.44
Nervous system disorders / Doenças do sistema nervoso	18 (10.29)	34 (5.28)	1.95
Pregnancy, puerperium, and perinatal conditions / Situações na gravidez, no puerpério e perinatais	1 (0.57)	21 (3.26)	0.18
Product problems / Problemas de produtos	3 (1.71)	2 (0.31)	5.52
Psychiatric disorders / Perturbações do foro psiquiátrico	0 (0.00)	23 (3.57)	0
Renal and urinary disorders / Doenças renais e urinárias	8 (4.57)	22 (3.42)	1.34
Reproductive system and breast disorders / Doenças dos órgãos genitais e da mama	0 (0.00)	9 (1.40)	0
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders / Doenças respiratórias, torácicas e do mediastino	7 (4.00)	35 (5.43)	0.74
Skin and subcutaneous tissues disorders / Afeções dos tecidos cutâneos e subcutâneos	23 (13.14)	48 (7.45)	1.76
Social circumstances / Circunstâncias sociais	0 (0.00)	0 (0.00)	**
Surgical and medical procedures / Procedimentos cirúrgicos e médicos	0 (0.00)	1 (0.16)	0
Vascular disorders / Vasculopatias	16 (9.14)	29 (4.50)	2.03
Total	175 (100%)	644 (100%)	**

Discussion

Number of signals published by PRAC for biologics compared to conventional medicines

Biologics were only introduced in the market in the 1980's, and therefore it was foreseen that fewer biological medicines were present in our search, a fact that was supported by the difference found in study sample sizes (Table 1). Our results demonstrate that, during the period observed by the study, the occurrence of new safety signals for biological medicines was significantly higher than the occurrence of new safety signals for conventional medicines. The frequency mean of safety signals is 4.17 for biologics compared to 2.52 for conventional medicines ($p < 0.05$) (Table 1). These results suggest that awareness and knowledge about the safety profiles of biologics are on an ascending trend, compared to conventional medicines. As more recently available medicines, with different specificities and lower marketing experience, biologics are prone to the identification of new safety signals as marketing experience increases.

Comparison of SOCs associated with signals published by PRAC for biologics and conventional medicines

The results of our study show that the three most relevant System Organ Classes (SOC) found to be related to traditional medicines signals are general disorders and administration site conditions (14.29%), skin and subcutaneous tissue disorders (7.45%) and gastrointestinal disorders (6.21%). General disorders and administration site conditions SOC includes generic signals such as drug-drug interactions, withdrawn and rebound, pain and discomfort, body temperature changes, among others. These conditions are familiar as adverse reactions of conventional medicines.

Regarding to biological medicines signals were mainly related to blood and lymphatic system disorders (13.71%), skin and subcutaneous tissue disorders (13.14%) and nervous system disorders (10.29%) SOC (Table 2).

The described safety profile for biologics includes ADRs that are usually linked to their pharmacologic actions and immunologic reactions, such as immunogenicity and administration-site reactions (26). This can result in a loss of efficiency or deficiency syndromes (for example, thrombocytopenia) (27, 28).

The relative risk (RR) for SOC of signals collected by PRAC was also evaluated for biological medicines in comparison with the conventional medicines (Table 2). If RR is greater than 1, the relative risk of generating a signal in the category of SOC was higher for

Discussão

Número de sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos comparativamente aos medicamentos convencionais

Os medicamentos biológicos foram introduzidos no mercado apenas na década de 1980 sendo expectável que menos medicamentos biológicos tenham sido encontrados nesta avaliação, em comparação com os medicamentos convencionais, facto que pode suportar a diferença na dimensão das amostras encontrada no período observado pelo estudo (Tabela 1). Foi encontrado um valor médio para a frequência de sinais publicados na amostra de medicamentos biológicos (4,17) estatisticamente superior ao valor médio da amostra para medicamentos convencionais (2,52) ($p < 0,05$). Sendo medicamentos mais recentes, com diferentes especificidades e uma menor experiência de comercialização, os medicamentos biológicos revelam suscetibilidade à identificação de novos sinais de segurança à medida que a experiência de utilização aumenta.

Comparação das SOC associadas aos sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos e medicamentos convencionais

De acordo com os resultados do estudo, as principais SOC relacionados com os sinais dos medicamentos convencionais são perturbações gerais e condições no local de administração, distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos e doenças gastrointestinais. A SOC perturbações gerais e condições no local de administração inclui sinais genéricos, tais como interações fármaco-fármaco, falta de adesão à terapêutica, síndrome de abstinência, dor e desconforto, alterações de temperatura corporal, entre outros. Estas condições são familiares como RAMs dos medicamentos tradicionais.

No que diz respeito aos medicamentos biológicos, os sinais estão principalmente relacionados com doenças do sangue e do sistema linfático, distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos e do sistema nervoso. As RAMs associadas aos medicamentos biológicos estão ligadas às suas ações farmacológicas e reações imunológicas, tais como reações de imunogenicidade e reações no local de administração (26). Isto pode resultar numa perda de eficácia ou de síndromes de deficiência (por exemplo, trombocitopenia) (27, 28).

Foi ainda avaliado o Risco Relativo (RR) por SOC dos sinais levantados pelo PRAC para fármacos biológicos em comparação com os tradicionais (Tabela 2). Se RR for superior a 1, o risco relativo da geração de um sinal na categoria dessa SOC é superior para o bioló-

the biological compared to traditional medicines. In our analysis the SOC with $RR > 1$ were: disorders of the blood and lymphatic system, disorders of the immune system, infections and infestations, neoplasms (malignant, benign and unspecified), disorders of the nervous system, product problems, kidney and urinary diseases, disorders of the skin and the subcutaneous tissue, and vascular disorders. Skin and the subcutaneous tissue SOC is among the three more relevant SOC for both samples, however RR is higher for biologics. These results are in agreement with the specificities already mentioned for biological products, taking into account that they are primarily immunogenic proteins, administered intravenously and that the structural variations between batches, or a biosimilar and its reference biological, can lead to significant changes in the profile of efficacy and safety (18). Ear and labyrinth disorders appear with $RR > 1$ due to a sign of deafness that has not been confirmed. The ADRs may be specific for the type of biological medicine, taking into account its mechanism of action: monoclonal antibodies, fusion proteins, enzymes and coagulation factors (mainly associated with skin reactions), cytokines (hematological disorders), and hormones (disturbance of the metabolism and nutrition) (29). Post-marketing studies confirm that the biological medicinal products, due to their effects on specific targets, have different trends in the safety profile in comparison with the conventional medicines (26).

Conclusion

The present study demonstrates that in the period observed by the study the number of signals published by PRAC for biological medicines is higher compared to the signals published for conventional medicines, which can result from an ascending trend on biologics safety profile awareness and knowledge, as they are more recently developed and complex molecules than conventional medicines. The relative risk (RR) for biological medicines is higher than for conventional medicines for signals related to the following System Organ Classes (SOC): disorders of the blood and lymphatic system, disorders of the immune system, infections and infestations, neoplasms (malignant, benign, and unspecified), disorders of the nervous system, problems with the product, kidney and urinary diseases, disorders of the skin and the subcutaneous tissue, and vascular disorders.

gico relativamente aos medicamentos convencionais. Na nossa análise as SOC com $RR > 1$ foram: distúrbios do sistema sanguíneo e linfático, distúrbios do sistema imunológico, infeções e infestações, neoplasias benignas malignas e não especificadas, distúrbios do sistema nervoso, problemas do produto, doenças renais e urinárias, distúrbios da pele e tecido subcutâneo e distúrbios vasculares. Observamos que a SOC distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos se encontra entre as três mais relevantes na análise de segurança para ambos os tipos de medicamentos mas o RR é superior para os medicamentos biológicos.

Estes resultados estão de acordo com o acima mencionado para os medicamentos biológicos, tendo em conta que são principalmente proteínas imunogénicas, administradas por via intravenosa e que as variações estruturais entre lotes, ou um biosimilar e o seu biológico de referência, podem conduzir a alterações significativas no perfil de eficácia e segurança (18). Afeções do ouvido e do labirinto aparecem com $RR > 1$ devido a um sinal de surdez que não foi confirmado. As RAMs podem ser específicas por tipo de biológico, tendo em conta o seu mecanismo de ação: anticorpos monoclonais, proteínas de fusão, enzimas e fatores de coagulação (associados principalmente com reações cutâneas), citocinas (distúrbios hematológicos) e hormonas (perturbações do metabolismo e da nutrição) (29). Os estudos pós-comercialização confirmam que os medicamentos biológicos, devido aos seus efeitos em alvos específicos, possuem diferentes tendências no perfil de segurança em comparação com os medicamentos convencionais (26).

Conclusão

Com base neste estudo podemos concluir que no período observado o número de sinais publicados pelo PRAC para medicamentos biológicos foi superior comparativamente aos sinais publicados para medicamentos tradicionais. Sendo moléculas mais complexas e mais recentes, o resultado encontrado sugere que o conhecimento e consciencialização sobre o perfil de segurança para os medicamentos biológicos se encontra em fase de crescimento.

Na nossa análise as SOC com $RR > 1$ para os medicamentos biológicos comparativamente aos convencionais foram: distúrbios do sistema sanguíneo e linfático, distúrbios do sistema imunológico, infeções e infestações, neoplasias benignas malignas e não especificadas, distúrbios do sistema nervoso, problemas do produto, doenças renais e urinárias, distúrbios da pele e tecido subcutâneo e distúrbios vasculares.

These preliminary results will be further explored, namely by mechanism of action or pharmacotherapeutic class, as ADRs may be specific by type of biological medicine.

One of the limitations of this study is that signals generated from EudraVigilance cannot be isolated by country, but comparative analyses with published data from other entities, such as the World Health Organization (WHO), Food and Drug Administration (FDA) and the Australian Therapeutic Goods Administration (TGA) are planned for the near future.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Estes resultados preliminares serão aprofundados, nomeadamente no respeitante ao mecanismo de ação ou classe farmacoterapêutica, uma vez que as RAMs podem ser específicas por medicamento biológico.

Uma das limitações deste estudo é o fato da base de dados EudraVigilance não permitir uma análise dos sinais gerados por país. Será realizada num futuro próximo uma análise comparativa com dados publicados por outras entidades, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a “Food and Drug Administration” (FDA) e a “Australian Therapeutic Goods Administration” (TGA).

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

References / Referências

1. Fornasier G, Francescon S, Leone R, Baldo P. An historical overview over Pharmacovigilance. *Int J Clin Pharm*. 2018;40(4):744–7.
2. Caron J, Rochoy M, Gaboriau L, Gautier S. The history of pharmacovigilance. *Therapie* [Internet]. 2016;71(2):129–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.therap.2015.12.007>
3. Brown P, Bahri P. ‘Engagement’ of patients and healthcare professionals in regulatory pharmacovigilance: establishing a conceptual and methodological framework. *Eur J Clin Pharmacol*. 2019;(1 September):1181–1192.
4. Klungsoyr K, Nordtveit TI, Kaastad TS, Solberg S, Sletten IN, Vik A-K. Epidemiology of limb reduction defects as registered in the Medical Birth Registry of Norway, 1970–2016: Population based study. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(7):e0219930. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0219930>
5. De Pretis F, Osimani B. New Insights in Computational Methods for Pharmacovigilance: E-Synthesis, a Bayesian Framework for Causal Assessment. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(12).
6. Arlett P, Portier G, De Lisa R, Blake K, Wathion N, Dogne JM, et al. Proactively managing the risk of marketed drugs: Experience with the EMA Pharmacovigilance Risk Assessment Committee. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(5):395–7.
7. Laroche M-L, Batz A, Géniaux H, Féchant C, Merle L, Maison P. Pharmacovigilance in Europe: Place of the Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) in organisation and decisional processes. *Therapies*. 2016;71(2):151–160.
8. Good pharmacovigilance practices (GVPs). European Medicines Agency. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/good-pharmacovigilance-practices>
9. Pacurariu AC, Coloma PM, van Haren A, Genov G, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM. A Description of Signals During the First 18 Months of the EMA Pharmacovigilance Risk Assessment Committee. *Drug Saf*. 2014;37(12):1059–66.
10. Kurz X. Advancing regulatory science, advancing regulatory practice. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2017;26(6):722–6.
11. Wisniewski AFZ, Bate A, Bousquet C, Brueckner A, Candore G, Juhlin K, et al. Good Signal Detection Practices: Evidence from IMI PROTECT. *Drug Saf*. 2016;39(6):469–90.
12. Medicines Agency E. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) Module IX-Signal management (Rev 1) Date of coming into effect of first version. 2017;(October 2017):1–25. Available from: www.ema.europa.eu
13. Shakir SAW. Thoughts on signal detection in pharmacovigilance. *Drug Saf*. 2007;30(7):603–6.
14. Potts J, Genov G, Segec A, Raine J, Straus S, Arlett P. Improving the Safety of Medicines in the EU: From signals to action. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;
15. Sardella M, Lungu C. Evaluation of quantitative signal detection in EudraVigilance for orphan drugs: possible risk of false negatives. *Ther Adv Drug Saf*. 2019;10:1–11.
16. Sangi DP. Synthetic strategies in drug discovery: Employing diversity-oriented synthesis. *Quim Nova*. 2016;39(8):995–1006.
17. Kinch MS. An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug Discov Today* [Internet]. 2015;20(4):393–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.003>
18. Kabir ER, Moreino SS, Kawsar M, Siam S. The Breakthrough of Biosimilars : A Twist in the Narrative of Biological Therapy. 2019;1–34.
19. Beaver JA, Howie LJ, Pelosof L, Kim T, Liu J, Goldberg KB, et al. A 25-year experience of us food and drug administration accelerated approval of malignant hematology and oncology drugs and biologics a review. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):849–56.
20. Danne T, Heinemann L, Bolinder J. New Insulins, Biosimilars, and Insulin Therapy. *Diabetes Technol Ther*. 2019;21(S1):S57–78.
21. Inotai A, Prins CPJ, Csanádi M, Vitezic D, Codreanu C, Kaló Z. Is there a reason for concern or is it just hype?—A systematic literature review of the clinical consequences of switching from originator biologics to biosimilars. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2017;17(8):915–26. Available from: <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1341486>
22. Vezér B, Buzás Z, Sebeszta M, Zrubka Z. Authorized manufacturing changes for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in European Public Assessment Report (EPAR) documents. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(5):829–34.
23. List of signals discussed at PRAC since September 2012 [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/signal-management/prac-recommendations-safety-signals#list-of-safety-signals-discussed-since-september-2012-section>
24. Simon SD. Andrology Lab Corner Understanding the Odds Ratio and the Relative Risk. *J Androl* [Internet]. 2001;22(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02212.x>
25. Glantz Stanton A. primer of biostatistics. 2005;(6):164.
26. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, Meyboom RHB, Straus SMJM, Leufkens HGM, Egberts TCG. Mapping the Safety Profile of Biologics. *Drug Saf*. 2010;33(10):865–78.
27. Sauna ZE, Lagassé D, Pedras-Vasconcelos J, Golding B, Rosenberg AS. Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2018;36(10):1068–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.008>
28. Bennett CL, Luminari S, Nissenon AR, Tallman MS, Klinge SA, McWilliams N, et al. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med*. 2004;351(14):1403–8.
29. Ingrassiotta Y, Cutroneo PM, Marciàno I, Giezen T, Atzeni F, Trifirò G. Safety of Biologics, Including Biosimilars: Perspectives on Current Status and Future Direction. *Drug Saf*. 2018;41(11):1013–1022.

Physico-mechanical properties of topical formulations based on different polymers

Propriedades físico mecânicas de formulações tópicas à base de diferentes polímeros

Victor Hugo Pacagnelli Infante, Lívia Salomão Calixto, Patrícia M. B. G. Maia Campos

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto University of São Paulo – Ribeirão Preto – Brazil

Email: pmcampos@usp.br

Abstract

The texture properties of formulations can be related to their sensory properties, and the correct choice of raw materials is an important tool to improve the sensorial properties of cosmetic formulations. This way, the objective of this study was to evaluate the physical-mechanical properties of different polymers applied in the cosmetic formulations and analyze how their concentration can affect these parameters. Twelve gel formulations were developed with four different polymers often used in cosmetic formulations in different concentrations: Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer, Hydroxyethylcellulose, Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7, and Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer. The system of physical-mechanical properties analysis was applied to characterize the texture profile in different parameters, as the cohesiveness and viscosity. The analysis of the obtained data showed that higher concentration of acrylate polymer is necessary to obtain a significant influence in the physical-mechanical parameters of the formulation. The parameter most affected by the hydroxyethylcellulose was the work of shear. The blend of Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 showed the most pronounced alterations in the texture profile. Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer did not alter the physico-mechanical properties of the formulations studied and Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer altered the texture parameters only when used in the lowest and the highest concentrations in the formulations. Finally, the type of polymers could result in formulations with different physico-mechanical properties, reflecting its performance when applied on the skin.

Keywords: texture profile, cosmetic formulations, polymers

Resumo

As propriedades de textura das formulações estão relacionadas com as propriedades sensoriais e a escolha correta das matérias-primas é uma importante ferramenta para melhorar as propriedades sensoriais das formulações cosméticas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-mecânicas de diferentes polímeros utilizados em formulações cosméticas e analisar como a concentração dos mesmos pode afetar estes parâmetros. Doze formulações de gel foram desenvolvidas com quatro diferentes polímeros altamente utilizados em formulações cosméticas em diferentes concentrações: Acryloyldimethyltaurate de Amônio/Copolímero VP, Hidroxietilcelulose, Poliácridamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7 e Acrilatos/Acrilato de Alquil C10-30Crossopolímero. O sistema de análise das propriedades físico-mecânicas foi utilizado para caracterizar o perfil de textura em diferentes parâmetros, como coesividade e viscosidade. A análise dos dados obtidos mostrou que é necessária uma maior concentração de polímero de acrilato para obter uma influência significativa nos parâmetros físico-mecânicos da formulação. O parâmetro de textura mais afetado pela hidroxietilcelulose foi o trabalho de cisalhamento. O blend de Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 mostrou alterações mais pronunciadas nos perfis de textura. Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer não alterou as propriedades físico mecânicas das formulações e o polímero Acrylates/C10-30 Alquil Acrilate Crosspolymer alterou essas propriedades somente quando foi usado nas menores e maiores concentrações. Por fim, o tipo de polímero pode resultar em formulações com diferentes propriedades físico mecânicas, o que reflete na performance das mesmas quando aplicadas na pele.

Palavras-chave: perfil de textura, formulações cosméticas, polímeros

Introduction

Sensory analysis is very important during the development of cosmetic formulations. Formulations with good sensory properties can represent a better reception by the consumer and, consequently, adherence to treatment. Quantitative Descriptive Analysis (QDA[®]) and the Spectrum[™] Descriptive Analysis (SDA) are two methods to evaluate the sensorial properties of topical products, however, these methods require time and a trained panel. (1, 2) For this, instrumental measurements can be chosen as an alternative, but it is necessary to study which methods are effective and useful for the proposed analysis. Such analyses can help the pharmaceutical and cosmetics companies to save time and money. (3, 4)

During the development of topical formulations, information about how the raw material(s) can influence the final product is very important. Many parameters can be modified, such as concentration of ingredients, protocol, and combination of raw materials. Such modifications can improve the physical characteristics of the formulation, which could reflect on the sensory properties. (5, 6)

This way, the correct choice of raw materials is essential to obtain an exceptional topical formulation, but more than quality, it is necessary to have information about how it can improve the physical-mechanical quality of the topical formulation. (7, 8) Different types of polymers are used to create gel formulations or to improve the rheological characteristics on other cosmetic formulations, such as emulsions. (9) In this context, knowledge about how they can influence the physical-mechanical characteristics is a good way to solve challenges in pharmaceutical and cosmetic technology. (10) The objective of this work was to study the physical-mechanical properties of different polymers applied in the topical formulations and to analyze how the polymer concentration can affect these properties using a system of physical and mechanical properties analysis.

Material and Methods

Developed formulations

Twelve gel formulations with four polymers in different concentrations were developed (Table I). The polymer concentrations were selected by the minimum, medium and maximum values of concentration use provided by the data sheets. Hydroxyethylcellulose (HEC, Natrosol[®] - Ashland) and the Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 mixture (SEPIGEL 305[™])

Introdução

Para desenvolver uma formulação tópica, é necessário obter uma fórmula estável e com um sensorial agradável. Uma formulação com alto desempenho sensorial significa uma boa recepção pelo público, aderência ao tratamento e demanda pelo produto. A Análise Descritiva Quantitativa e a Análise Descritiva do Spectrum[™] (SDA) são dois métodos para avaliar as propriedades sensoriais de produtos tópicos. No entanto, esses métodos exigem tempo e um painel treinado. (1, 2) Para isso, as medidas instrumentais podem ser escolhidas como uma alternativa, mas é necessário estudar quais métodos são eficazes e úteis para a análise proposta. Isso representa uma melhoria na indústria farmacêutica, pois poderia ajudar a economizar tempo e dinheiro. (3, 4)

Durante o desenvolvimento de formulações tópicas, informações sobre como a matéria-prima pode influenciar o produto final são muito importantes. Muitos parâmetros podem ser modificados como concentração de ingredientes, protocolo e combinação de matérias-primas. Pode melhorar as características físicas da formulação, o que poderia refletir nas propriedades sensoriais. (5, 6)

Desta forma, a escolha correta das matérias-primas é essencial para obter uma formulação tópica excepcional, mas mais do que qualidade, é necessário obter informações sobre como melhorá-la. (7, 8) Diferentes tipos de polímeros são usados para criar formulações em gel ou para melhorar as características reológicas em outras formulações cosméticas. (9) Neste contexto, o conhecimento sobre como eles podem influenciar as características físico-mecânicas é uma boa maneira de resolver dificuldades na tecnologia farmacêutica e cosmética. (10)

O objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades físico-mecânicas de diferentes polímeros utilizados na indústria farmacêutica e analisar como a concentração pode afetar esses parâmetros por meio de um sistema de análise de propriedades físicas e mecânicas.

Material e Métodos

Desenvolvimento de formulações

Foram desenvolvidas doze formulações de gel com quatro polímeros em diferentes concentrações para analisar os efeitos dos mesmos nas propriedades de textura (Tabela I). As concentrações dos polímeros foram selecionadas pelos valores mínimo, médio e máximo de concentração fornecidos pelas fichas técnicas. Para

– SEPPIC) were applied in the minimum concentration of 2% based on the sensitivity of the Texture Analysis system to perform the physical-mechanical analysis. All formulations were developed considering a minimal variation on their components to avoid interferences in the physical-mechanical properties results. To confirm their stability, an aliquot of 5 grams of each formulation was weighed and centrifuged at 3000 rpm, 3 cycles of 30 minutes each (CentriBio) at room temperature. The polymers used in the gel formulations were Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex AVL® - Clariant) and HEC. Each was weighed and prepared in a volume of water sufficient to obtain 100 g of formulation. Preservatives (ChemYUnion) were weighed and dissolved in the required amount of propylene glycol (Synth) and incorporated in the formulation. For HEC, the polymer solution was heated to 60 °C in a hot plate (Fisaton) and stirred until the polymer chain was constructed.

o Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7 (SEPIGEL 305™ – SEPPIC) e o hidroxyethylcellulose (HEC, Natrosol™ - Ashland) utilizou-se o mínimo de 2% devido à sensibilidade do sistema de Análise de Textura para realizar as análises físico-mecânicas. Todas as formulações foram desenvolvidas considerando uma variação mínima em seus componentes para evitar interferências nos resultados das propriedades físico-mecânicas. Para confirmar a sua estabilidade, 5g de cada formulação foi centrifugadas a 3000 rpm, 3 ciclos de 30 minutos (CentriBio) à temperatura ambiente. Acryloyldimethyltaurate de Amônio / Copolímero VP (Aristoflex AVL - Clariant) e HEC foram pesados e dispersos em quantidade suficiente de água para obter 100 g de formulação. Os conservantes foram pesados e solubilizados na quantidade requerida de propilenoglicol (Synth) e incorporados na formulação. Para HEC, a solução com o polímero foi aquecida até 60 °C em placa quente (Fisaton) e foi agitada até a construção da cadeia polimérica.

Table 1/ Tabela 1 – Formulation composition / Composição das Formulações

Polymer / Polímero	INCI Name / INCI Nome	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3
Aristoflex® AVC	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer Acryloyldimethyltaurate de Amônio/Copolímero VP	0.5%	2.5%	5.0%
Natrosol™ 250 HR/HHR	Hydroxyethylcellulose Hidroxiethylcelulose	2.0%	3.0%	5.0%
SEPIGEL™ 305	Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7	2.0%	3.0%	5.0%
CARBOPOL® ULTREZ 20	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer Acrilatos/Acrilato de Alquil C10-30 Crosspolímero	1.0%	4.0%	8.0%

Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 and Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (AAAC, Carbopol - Lubrizol) were weighed and dissolved in a volume of water sufficient to obtain 100 g of formulation. Preservatives (ChemYUnion) and EDTA (LabChem) were weighed and dissolved in the required amount of propylene glycol and incorporated into the formulation. The pH was then adjusted to 6.0 using AMP 95 (ANGUS Chemical) to have the formation of polymeric netting. All the formulations utilized 3% of propylene glycol (Synth) and sufficient concentration of preservative (0.8%).

Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7 foram dispersos em quantidade suficiente de água para obter 100 g de formulação. Os conservantes e EDTA (LabChem) foram solubilizados na quantidade requerida de propilenoglicol e incorporados na formulação. Acrilatos / C10-30 Acrilato Alquil Crosspolymer (AAAC, Carbopol - Lubrizol) foram pesados e dispersos em quantidade suficiente de água para obter 100 g de formulação. Os conservantes (ChemYUnion) e EDTA (LabChem) foram solubilizados na quantidade necessária de propilenoglicol e incorporados à formulação e depois disso, o pH foi ajustado para 6,0 usando AMP 95 (ANGUS Chemical) para se obter a formação do polímero. Todas as formulações utilizaram 3% de propilenoglicol (Synth) e a concentração suficiente de conservante (0,8%).

Texture Analysis

For the texture analysis, the system of physical and mechanical properties analysis, a model TA.XT/Plus 50 instrument (Stable Microsystems, United Kingdom), was utilized. The method used to determine the texture consisted of inserting a probe in the analytical sample, two consecutive times, with a defined speed and depth, leading to pre-defined recovery period between the end of the first compression and the beginning of the second one. From the resulting graph of force (N) per time (t) the following parameters were obtained: cohesiveness, consistency, firmness, viscosity index and work of shear. For work of shear the height was 25 cm and the probe velocity 30 mm/s. The texture analyses were established with 100 mm of height and 30 mm/s of velocity.

Análise De Textura

Para a análise de textura, utilizou-se o sistema de análise de propriedades físicas e mecânicas, modelo TA.XT / Plus 50 (Stable Microsystems, Reino Unido). O método usado para determinar a textura consiste em inserir uma sonda na amostra analítica, duas vezes seguidas, com velocidade e profundidade definidas, levando a um período de recuperação pré-definido entre o final da primeira compressão e o início da segunda. A partir do gráfico de força resultante (N) por tempo (t), foram obtidos os seguintes parâmetros: coesão, consistência, firmeza, índice de viscosidade e trabalho de cisalhamento (Figura 1). Para o trabalho de cisalhamento a altura foi de 25cm e a velocidade de 30 mm/s. As análises de textura foram estabelecidas com 100 mm de altura e 30 mm/s de velocidade.

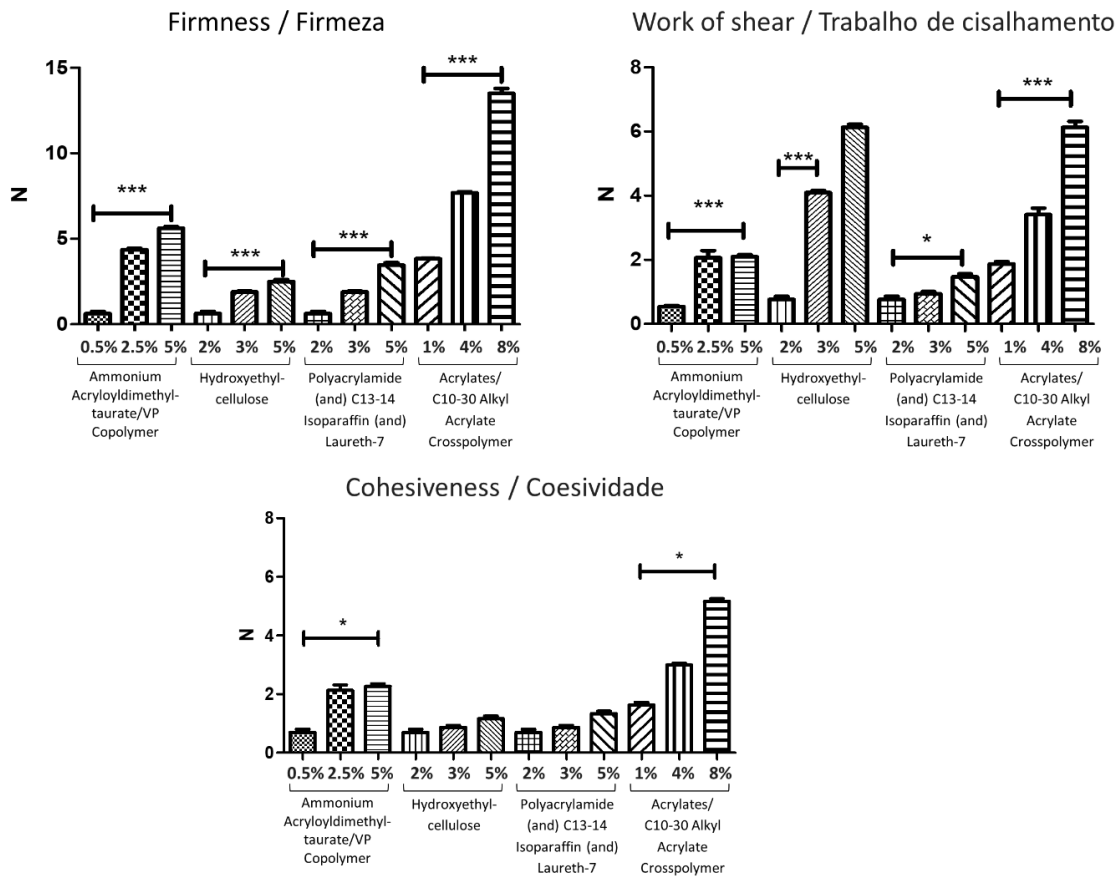


Figure 1/ Figura 1 – Influence of polymer concentration on cohesiveness, firmness and work of shear, where (*) means $0.01 < p < 0.05$; (**) means $0.001 < p < 0.01$, and (***) means $p < 0.001$. / Influência da concentração de polímeros na coesão, firmeza e trabalho de cisalhamento, onde (*) significa $0.01 < p < 0.05$; (**) $0.001 < p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$.

Statistical Analysis

The data obtained was compared by Kruskal and Wallis and a Dunns posttest ($\alpha=0.05$), except when the data had a normal distribution, in the cases of consistency [Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7], work of shear [HEC and Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7], and viscosity [Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7]. In latter cases, the one-way analysis of variance test was used and the Tukey posttest to compare the concentrations.

Results and Discussion

The Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer is characterized as an anionic gel, easy to work with because is pre-neutralized and stable. It can also be used as a thickening agent in topical and cosmetic formulations, such as emulsions. The concentrations of 0.5% and 5.0% showed high significant difference for all parameters, but cohesiveness presented the lower statistical difference: Thus, this polymer needs a greater concentration change to present a significant contribution on the physical-mechanical parameters analyzed. The Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 is pre-neutralized and forms inverse emulsion instantly by simply adding water. With this formulation we observed a linear result with the increase of its concentration on the physical mechanical proprieties. This could be more related with the inverse emulsion characteristic, since its composition can form globules, not only polymeric networks. (11)

For AAAC, it was observed that to obtain significant changes on physical and mechanical characteristics it was necessary to use eight times more of this polymer. Cohesiveness, firmness, and work of shear are properties with similarities as they are closely related to the polymer structure of the selected material. It is important to highlight the influence of cohesiveness and work of shear on the performance of the formulation on the skin. Thus, they can impact the sensorial properties of the formulations. (12) This way, polymers with higher differences between the concentrations can have the most influence on sensorial characteristics and acceptance of topical formulation. This can be observed in the AAAC, for example, with a good correlation between these three parameters.

It is interesting to highlight the impact of the type of the polymers, not just the variation on concentration, in the work of shear. This result can be observed especially

Análise Estatística

De acordo com a distribuição amostral dos dados obtidos, os mesmos foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal e Wallis e Dunn ($\alpha = 0,05$) e pelo teste paramétrico *one-way* de análise de variância e o teste complementar de Tukey para comparar as concentrações quando os dados que apresentaram distribuição normal para os dados dos parâmetros de consistência [Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7], trabalho de cisalhamento [HEC e Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7] e viscosidade [Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7].

Resultados e Discussão

O polímero Amônio Acryloyldimetethyltaurate/VP Copolymer é caracterizado como um gel aniônico, sendo de fácil preparação por ser pré-neutralizado e estável. Também pode ser utilizado como agente espessante em formulações cosméticas, como as emulsões. As concentrações de 0,5% e 5,0% apresentaram diferença significativa para todos os parâmetros, porém, o parâmetro a coesividade apresentou a menor diferença estatística. Dessa forma, foi possível observar que este polímero necessita de maior variação em sua concentração para influenciar significativamente os parâmetros físico-mecânicos analisados.

Poliacrilamida (e) C13-14 isoparafina (e) Laureth-7 é pré-neutralizada e forma uma emulsão inversa instantaneamente simplesmente adicionando água. Nesta formulação, observamos um resultado linear com o aumento de sua concentração nas propriedades físico-mecânicas. Poderia estar mais relacionado com a característica de emulsão inversa, já que em sua composição é possível observar a formação de glóbulos e não apenas redes poliméricas. (11) Para o polímero AAAC observou-se que, para obter mudanças significativas nas características físico-mecânicas, foi necessário utilizar oito vezes mais desse polímero.

Coesão, firmeza e trabalho de cisalhamento são propriedades com similaridades, pois estão intimamente relacionadas à estrutura do polímero do material selecionado. É importante destacar a influência da coesão e do trabalho de cisalhamento no desempenho da formulação sobre a pele. Assim, podem impactar nas propriedades sensoriais das formulações. (12) Desta forma, polímeros com maiores diferenças entre as concentrações podem influenciar mais em sensorial e aceitação de formulação tópica. Esse comportamento pode ser observado no AAAC, por exemplo, com uma boa correlação entre estes três parâmetros.

between the formulations with high polymer concentration. Likely this characteristic is highly correlated with the firmness. Both the work of shear and firmness presented significant difference not just between the different concentrations, but also the type of polymer.

The increase in polymer concentration results in an increase in the physical and mechanical parameters of formulations. However, in the formulations based on HEC, the firmness parameter was the most influenced by the polymer concentration, differently than in the other formulations. For the others, the work of shear was the most affected, showing a more direct influence with the sensorial. (12, 13) Firmness is a feature related to the structure of the formula itself, so increases in HEC concentrations will mainly influence how the polymeric formula behaves when stored, for example (Figure 1).

Viscosity and consistency are properties related with the structure of the formulation. (14) This way, increases on concentration of certain polymers as HEC, for example, can result more structured formulations. This information is important for the stability of the final formulation. Both viscosity and consistency increase linearly with the increase of polymer concentration. Thus, the physico-mechanical characteristics end up behaving in the same way with the increase of the concentrations of the studied polymers (Figure 2).

É interessante destacar o impacto do tipo de polímero, e não apenas a variação da concentração, no trabalho de cisalhamento. Este resultado pode ser observado especialmente entre as formulações com alta concentração de polímeros. Provavelmente esta característica está muito correlacionada com a firmeza. Ambos, trabalho de cisalhamento e firmeza, apresentaram diferença significativa não apenas entre as diferentes concentrações, mas o tipo de polímero também.

O aumento da concentração do polímero resulta num aumento das propriedades físicas e mecânicas. No entanto, para a formulação a base de HEC, o parâmetro firmeza foi a mais influenciada pela concentração do polímero, diferentemente das demais formulações. Para os demais, o trabalho de cisalhamento foi o mais afetado, mostrando uma influência mais direta com o sensorial. (12, 13) Firmeza é uma característica relacionada à estrutura da própria formulação, portanto, os aumentos nas concentrações de HEC influenciarão principalmente como a fórmula polimérica se comporta quando armazenada, por exemplo (Figura 1).

Viscosidade e consistência são propriedades relacionadas com a estrutura da própria formulação. (14) Desta forma, o aumento da concentração de certos polímeros como o HEC, por exemplo, podem resultar em formulações mais estruturadas. Esta informação é importante para a estabilidade da formulação final. Tanto a viscosidade como a consistência aumentam linearmente com o aumento da concentração dos polímeros. Assim, as características físico-mecânicas acabam se comportando da mesma forma com o aumento das concentrações dos polímeros estudados (Figura 2).

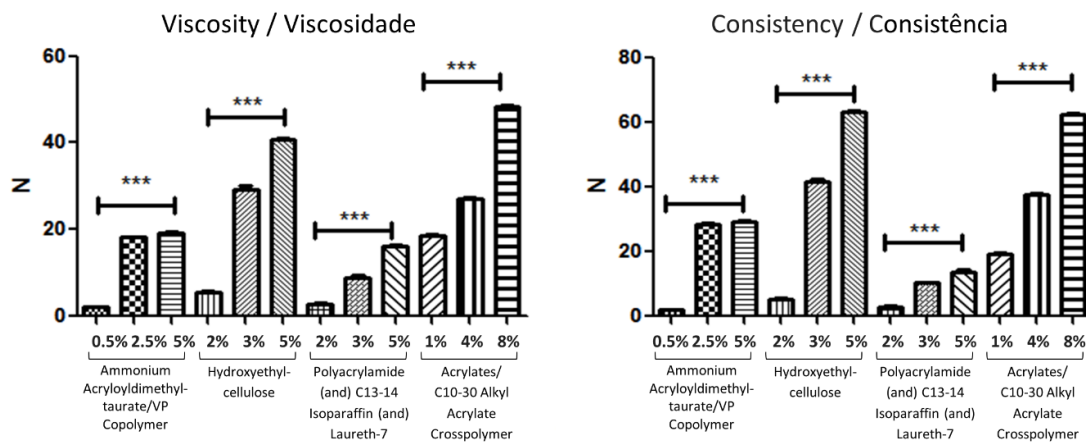


Figure 2/ Figura 2 – Influence of polymer concentration on viscosity and consistency, where (***) means $p < 0.001$. / Influência da concentração de polímero na viscosidade e consistência, onde (***) significa $p < 0.001$

The structure of polymeric material has an important role on these characteristics. Polymers with a cyclic lateral chain, AAAC, had less improvement of viscosity and consistency with the increase of polymer concentration. This polymer has a cyclic amide on its lateral chain, which means that the total volume of polymer will be more representative and can change the structural properties of formulations as viscosity. The carbomer AAAC was different because its lateral chain does not have a cyclic chain, so it was possible to create a better cross-linked 3D-structure, with a more compact formulation, with a large increase on physical-mechanical parameters with lower concentrations of polymer. (15-17)

HEC has a smaller lateral chain when compared to the other polymers cited previously. For this reason, when the concentration is increased 2.5 times, the results of viscosity and consistency are the same as for the AAAC when it was increased 8 times. (18-21)

It was possible to observe statistical differences between all the formulations with the higher polymer concentrations. However, in the lower concentrations significant differences between the formulations with different polymers were not found. Thus, regarding consistency, a significant difference ($p < 0.05$) was found between the minimum values of HEC, AAAC, and Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7, likely because Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 is an inverse emulsion. In Figure 2, it is possible to observe that increases in concentration of Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 did not greatly influence consistency.

Jones, Woolfson, and Brown (1997) (22) demonstrated in their study that cohesiveness decreased with the increase of the polymers' concentration. In our study, this property had a non-significant increase to HEC and Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7, however, for Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer and AAAC it was possible to observe a significant increase ($p < 0.05$) with the increase of polymer concentration. Additionally, the higher concentration of AAAC was significant different than the other polymers ($p < 0.001$) in the higher concentrations. It is important to highlight that in their study, HEC was combined with chlorhexidine, which could modify this parameter.

Calixto and Maia Campos (2017) (12) showed in their study that the relationship between firmness and cohesiveness was perfect and positive, that is, if one of these parameters increases the other will also increase proportionally. In our study it happens with all formulations as the concentration of polymers increases. However, for HEC the difference between both parameters

A estrutura do material polimérico tem um papel importante nessas características. Polímeros com cadeia lateral cíclica, Acryloyldimethyltaurate de Amônio/ Copolímero VP, tiveram menor melhora da viscosidade e consistência com o aumento da concentração de polímero. Este polímero tem uma amida cíclica na sua cadeia lateral, o que significa que o volume total de polímero será mais representativo e pode alterar as propriedades estruturais das formulações como viscosidade. Para o carbômero AAAC foi diferente porque sua cadeia lateral não possui uma cadeia cíclica, sendo possível estruturar uma melhor estrutura 3D reticulada, tendo uma formulação mais compacta, com grande aumento nos parâmetros físico-mecânicos com menor concentração de polímero. (15-17)

A HEC possui uma cadeia lateral menor quando comparada aos demais polímeros citados anteriormente. Por essa razão, quando a concentração aumenta 2,5 vezes, os resultados de viscosidade e consistência são semelhantes ao aumento de 8 vezes na concentração do acrilato Acrilates/C10-30 Alquil Acrilate. (18-21)

Foi possível observar diferenças estatística entre todas as formulações com as maiores concentrações de polímeros. No entanto, nas concentrações mais baixas não foram encontradas diferenças significativas entre as formulações com diferentes polímeros. Entretanto, para a consistência, foi encontrada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores mínimos de HEC, AAAC, e Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7, provavelmente porque o Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7 é uma emulsão inversa. Na Figura 2 é possível observar que aumentos na concentração de Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7 não influenciaram de forma pronunciada na consistência.

Jones, Woolfson, e Brown (1997) (22) mostraram em seu estudo que a coesão diminuiu com o aumento da concentração de polímeros como HEC. Em nosso estudo, essa propriedade teve um aumento não significativo para HEC e Poliacrilamida (e) Isoparafina C13-14 (e) Laureth-7, no entanto, para Acryloyldimethyltaurate de Amônio / Copolímero VP e AAAC foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de polímero. Além disso, a maior concentração de HEC foi significativamente diferente dos demais polímeros ($p < 0,001$) nas maiores concentrações. É importante ressaltar que, no estudo citado, o HEC foi combinado com a clorexidina, o que poderia modificar esse parâmetro.

Calixto e Maia Campos (2017) (12) mostraram em seu estudo que a relação entre firmeza e coesão era perfeita e positiva, ou seja, se um desses parâmetros aumenta, o outro também aumenta proporcionalmente. Em nosso

was higher in relation to the others. This may affect the sensory properties of the formulation, since cohesiveness is related to the performance of the formulation when applied, while the firmness is more correlated with the structure of the formulation. In fact, it was possible to observe the very similar behavior between work of shear and cohesiveness in the measurements (Figure 2). However, for HEC, the alterations in the concentration reflected in a higher increase in the firmness, likely because the HEC did not present lateral chains in its structure.

Higher viscosities associated to carbomers compared to other synthetic polymers were found in the literature. (23, 24) Even with this superior behavior, all the viscosities in minimal concentrations showed no significant difference between each other and low values. This characteristic is desired in cosmetic vehicles because of their high viscosity values, which implies a superior work of shear on skin, impairing the spreadability. (25, 26)

All polymers, with their structural characteristics, can help to improve sensorial proprieties; however, the knowledge about how polymers and their concentrations can influence the sensorial proprieties is important for the correct choice of these raw materials. (5)

Finally, considering that there are a few studies reported to physico-mechanical properties of the formulation based on polymers, the present study is important for a better comprehension of raw materials on topical formulations. Furthermore, this study can be useful for future pharmaceutical studies on topical formulations, giving information about better concentrations of polymers to be utilized. (21, 22, 27)

Conclusions

The Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 polymer was the modifying agent with the greatest influence on the physico-mechanical properties of the developed formulations when the concentration varied without changing the other raw materials of the formulations. On the other hand, the Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer did not alter the physico-mechanical properties of the formulations

estudo, isso acontece com todas as formulações à medida que a concentração de polímeros aumenta. No entanto, para o HEC a diferença entre os dois parâmetros foi muito superior em relação aos demais. Isso pode provavelmente afetar as propriedades sensoriais da formulação, uma vez que a coesão está relacionada ao desempenho da formulação quando aplicada, enquanto a firmeza está mais correlacionada com a estrutura da formulação. De fato, foi possível observar o comportamento muito semelhante entre o trabalho de cisalhamento e coesão nas medições (Figura 2). No entanto, para o polímero HEC, as alterações na concentração refletiram em um aumento maior na firmeza. Provavelmente porque o HEC não apresenta cadeias laterais em sua estrutura.

Viscosidades mais altas associadas aos carbômeros em comparação com outros polímeros sintéticos foram encontradas na literatura. (23, 24) Mesmo com este comportamento superior, todas as viscosidades em concentrações mínimas não apresentaram diferença significativa e valores baixos. Essa característica é desejada em veículos cosméticos por causa de seus altos valores de viscosidade, o que implica em um trabalho superior de cisalhamento na pele, prejudicando a espalhabilidade. (25, 26)

Todos os polímeros, com suas características estruturais, podem ajudar a melhorar as propriedades sensoriais; entretanto, o conhecimento sobre como os polímeros e suas concentrações podem influenciar as propriedades sensoriais é importante para a escolha correta dessas matérias-primas. (5)

Por fim, considerando que existem poucos estudos relatados que avaliam as propriedades físico-mecânicas de formulações à base de polímeros, o presente estudo contribui para uma melhor compreensão do comportamento das matérias-primas adicionadas em formulações de uso tópico. Além disso, pode contribuir para futuros estudos farmacêuticos que envolvem o desenvolvimento de formulações tópicas fornecendo informações sobre melhores concentrações de polímeros a serem utilizados. (21, 22, 27)

Conclusões

O polímero Poliacrilamida (e) C13-14 isoparafina (e) Laureth-7 foi o agente modificador com maior influência nas propriedades físico-mecânicas das formulações desenvolvidas quando variou-se a concentração sem alterar as demais matérias-primas das formulações. Por outro lado, o Acryloyldimethyltaurate de Amônio / Copolímero VP, não alterou as propriedades físico-mecânicas das formulações estudadas. O polímero HEC

studied. The HEC polymer showed to be more instable with increasing concentration. For the carboxyvinilic polymer, a significant alteration in the parameters was observed when the lowest and the highest concentrations of the polymer were applied in the developed formulations.

Finally, the type of polymers, as well as its lateral chains, could result in formulations with different physico-mechanical properties, reflecting its performance when applied on the skin. Therefore, the evaluation of the physico-mechanical properties of cosmetic formulations contributes to a better understanding of the behavior of the formulations during application on the skin, which can influence in the performance and acceptance of the same.

Acknowledgments

We would like to thank FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (proc 2014/11460-5) for the financial support received.

Conflict of Interests

None of the authors declared any conflict of interests

mostrou-se mais instável com o aumento da concentração. O tipo de polímero, assim como suas cadeias laterais, poderia resultar em formulações com propriedades físico-mecânicas diferentes, refletindo sobre seu desempenho na superfície da pele. Portanto, a avaliação das propriedades físico-mecânicas de formulações cosméticas contribui para um melhor entendimento do comportamento das formulações durante a aplicação na pele, o que pode influenciar no desempenho e aceitação das mesmas.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (proc 2014/11460-5) pelo apoio financeiro recebido.

Conflito de Interesses

Nenhum dos autores declarou qualquer conflito de interesses

References/ Referências

1. Munoz, A. M., and G. V. Civile. "The spectrum descriptive analysis method." *Manual on descriptive analysis testing for sensory evaluation* (1992): 22-34.
2. Stone, Herbert, et al. "Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis." *Descriptive Sensory Analysis in Practice* (2008): 23-34.
3. Meullenet, J-FC, et al. "Bi-cyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture." *Journal of Texture Studies* 28.1 (1997): 101-118.
4. Gilbert, Laura, et al. "Impact of polymers on texture properties of cosmetic emulsions: a methodological approach." *Journal of Sensory Studies* 27.5 (2012): 392-402.
5. Wasan, D. T., A. D. Nikolov, and F. Aimetti. "Texture and stability of emulsions and suspensions: role of oscillatory structural forces." *Advances in colloid and interface science* 108 (2004): 187-195.
6. Gilbert, Laura, et al. "Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 124 (2013a): 21-31.
7. Parente, Maria Emma, and G. Solana. "Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties." *International Journal of Cosmetic Science* 27.6 (2005): 354-354.
8. Dooley, Lauren M., Koushik Adhikari, and E. D. G. A. R. CHAMBERS IV. "A general lexicon for sensory analysis of texture and appearance of lip products." *Journal of sensory studies* 24.4 (2009): 581-600.
9. Lee, In-Suk, et al. "Terminology development and panel training for sensory evaluation of products including aqua cream." *Journal of sensory studies* 20.5 (2005): 421-433.
10. Jones, D. S., and A. D. Woolfson. "Measuring sensory properties of semi-solid products using..." *Pharmaceutical Manufacturing Review* 9.1 (1997): S3-S3.
11. Armanet, Luc, and David Hunkeler. "Phase inversion of polyacrylamide-based inverse-emulsions: Influence of inverting-surfactant type and concentration." *Journal of applied polymer science* 103.6 (2007): 3567-3584.
12. Calixto, Livia Salomão, and P. M. B. G. Maia Campos. "Physical-Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties." *International journal of cosmetic science* 39.5 (2017): 527-534.
13. Yılmaz, Emin, and Mustafa Ögütçü. "Comparative analysis of olive oil organogels containing beeswax and sunflower wax with breakfast margarine." *Journal of food science* 79.9 (2014): E1732-E1738.
14. Calixto, Livia Salomão, Victor Hugo Pacagnelli Infante, and Patrícia MBG Maia Campos. "Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements." *AAPS PharmSciTech* (2018): 1-8.
15. Cruz-Silva, Rodolfo, et al. "Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer." *European polymer journal* 43.8 (2007): 3471-3479.
16. Behera, B., et al. "Physical and mechanical properties of sunflower oil and synthetic polymers based bigels for the delivery of nitroimidazole antibiotic—A therapeutic approach for controlled drug delivery." *European Polymer Journal* 64 (2015): 253-264.
17. Lefrançois, Pauline, et al. "Insights into Carbopol gel formulations: Microscopy analysis of the microstructure and the influence of polyol additives." *Journal of Applied Polymer Science* 132.46 (2015).
18. Lin, Fang, et al. "Synthesis and structural characterization of methacrylic acid/octadecyl acrylate-graft-poly (methylhydrosiloxane) by hydrosilylation." *Journal of applied polymer science* 107.6 (2008): 3773-3780.
19. Wang, Wei, and Sv Arne Sande. "Monitoring of macromolecular dynamics during a chemical cross-linking process of hydroxyethylcellulose derivatives by dynamic light scattering." *European Polymer Journal* 58 (2014): 52-59.
20. Donnelly, Marc W., Mahilet Hailemichael, and Matthew W. Liberatore. "Altering the viscosity of cationically modified cellulose polymers by the addition of salt." *Journal of Applied Polymer Science* 132.11 (2015).
21. Gilbert, Laura, et al. "Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 421 (2013b): 150-163.
22. Jones, David S., A. David Woolfson, and Andrew F. Brown. "Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers." *International journal of pharmaceutics* 151.2 (1997): 223-233.
23. Graessley, William W. "Polymer chain dimensions and the dependence of viscoelastic properties on concentration, molecular weight and solvent power." *Polymer* 21.3 (1980): 258-262.
24. Limsuwan, Tunyaluk, Prapaporn Boonme, and Thanaporn Amnuaitit. "Study on the Antioxidant Activities of Gel Containing *Tagetes erecta* (L.)." *Advanced Materials Research*. Vol. 747. Trans Tech Publications, 2013.
25. Montenegro, Lucia, et al. "Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E." *Cosmetics* 2.1 (2015): 35-47.
26. Schwartz, Naomi Oshinsky. "Adaptation of the sensory texture profile method to skin care products." *Journal of Texture Studies* 6.1 (1975): 33-42.
27. Mendes Fossa Shirata, Marina, and Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos. "Importância do perfil de textura e sensorial no desenvolvimento de formulações cosméticas." *Surgical & Cosmetic Dermatology* 8.3 (2016).

Phosphatidylcholine bilayers trigger the degradation of licofelone

As bicamadas de fosfatidilcolina induzem a degradação do licofelone

Catarina Pereira-Leite^{1,2,a}, Cláudia Nunes¹, Iolanda M. Cuccovia², Salette Reis¹

¹LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

^a current affiliation: CBIOS, Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

E-mail: catarina.leite@ulusofona.pt, ^a current affiliation address

Abstract

This is the first report, to the best of our knowledge, on the degradation of licofelone, a dual cyclooxygenase-lipoxygenase inhibitor under development, in phosphatidylcholine bilayers. With the objective of characterizing licofelone-phosphatidylcholine interactions to understand its better gastric tolerability over conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, our preliminary data showed that the lower the pH, the higher the rate and extent of licofelone degradation in the presence of phosphatidylcholine liposomes. The lipid concentration was another critical factor influencing the rate and extent of licofelone degradation, suggesting that phosphatidylcholine bilayers may act as a catalyst. These data highlight the need of considering lipids in drug development to better predict the drug pharmacokinetics prior to clinical evaluation.

Keywords: Anti-inflammatory drugs, dual COX-LOX inhibitors, liposomes, UV-Vis spectrophotometry

Resumo

Este trabalho demonstra pela primeira vez, segundo julgamos saber, a degradação do licofelone, um inibidor duplo da cicloxigenase e da lipoxigenase em desenvolvimento, em bicamadas de fosfatidilcolina. Com o objetivo de caracterizar as interações do licofelone com a fosfatidilcolina para melhor entender a sua melhor tolerabilidade gástrica em relação aos anti-inflamatórios não esteroides convencionais, os resultados preliminares obtidos demonstraram que quanto menor o pH, maior a velocidade e a extensão da degradação do licofelone na presença de lipossomas de fosfatidilcolina. A concentração lipídica foi outro fator determinante quanto à velocidade e a extensão da degradação deste fármaco, sugerindo que as bicamadas de fosfatidilcolina poderão atuar como um catalisador. Estes resultados destacam a necessidade de considerar os lípidos durante o desenvolvimento de novos fármacos para melhor prever as suas propriedades farmacocinéticas antes da avaliação clínica.

Palavras-chave: Medicamentos anti-inflamatórios, inibidores duplos COX-LOX, lipossomas, espectrofotometria UV-Vis

Introduction

Licofelone (Figure 1) is a drug under development, considered as one of the most promising dual inhibitors of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX). This compound was developed as alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to improve their safety profile through the additional inhibition of 5-LOX (1). According to cell-based studies and animal tests, licofelone is a potent inhibitor of COX-1, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1), and 5-LOX, reducing the eicosanoid biosynthesis from both pathways. The drug directly inhibits COX-1 and mPGES-1 but it causes the reduction of 5-LOX products by interfering with FLAP (the 5-LOX activating protein) (2-4). The additional inhibition of 5-LOX is an important advantage of licofelone in comparison to NSAIDs, as it causes the reduction of LTB₄ and cysteinyl-leukotrienes (CysLTs) levels, which are important mediators of leukoattraction and broncho- and vasoconstriction (respectively). High levels of these leukotrienes, which are observed upon NSAIDs administration, play an important role in the gastrointestinal (GI) toxicity induced by nonselective NSAIDs. (1, 5) Thus, the dual inhibition of COX and 5-LOX cascade may maintain the efficacy and improve the tolerability of this anti-inflammatory therapy.

Introdução

O licofelone (Figura 1) é um fármaco em desenvolvimento muito promissor na categoria dos inibidores duplos da ciclooxigenase (COX) e da 5-lipoxigenase (5-LOX). Este composto foi desenvolvido para ser uma alternativa mais segura aos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), conseguida através da inibição adicional da 5-LOX (1). De acordo com estudos celulares e testes animais, o licofelone é um inibidor potente da COX-1, da sintetase microsossomal da prostaglandina E (mPGES-1) e da 5-LOX, causando a redução da biossíntese de eicosanoides provenientes das duas vias (2-4). A inibição adicional da 5-LOX é uma vantagem importante do licofelone em comparação com os AINEs, já que causa a redução dos níveis de LTB₄ e dos cisteinil-leucotrienos, os quais são importantes mediadores da atração leucocitária e da bronco e vasoconstrição (respectivamente). Elevados níveis destes leucotrienos são induzidos pela administração de AINEs e desempenham um papel importante na ocorrência de toxicidade gastrointestinal (GI) causada pelos AINEs não seletivos (1,5). Assim sendo, é provável que a inibição dupla da COX e da 5-LOX possam manter a eficácia e melhorar a segurança da terapia anti-inflamatória.

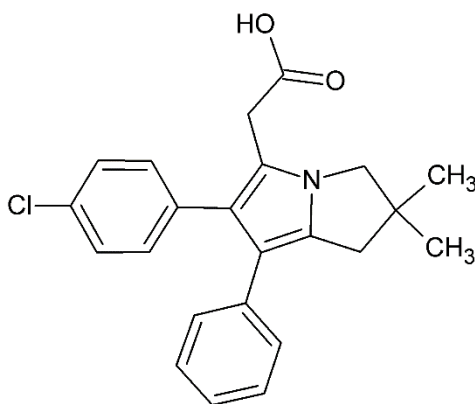


Figure 1/ Figura 1 - Structural formula of licofelone/
Fórmula estrutural do licofelone.

Preclinical and clinical studies have been supporting such hypothesis. Animal studies have proven licofelone efficacy as an anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antiplatelet, antiasthmatic, and antiarthritic agent (1, 6). Preclinical studies have also indicated that licofelone is better tolerated in the GI tract and cardiovascular (CV) system than NSAIDs (7-9). Thus, licofelone has entered clinical trials for the treatment of osteoarthritis. Phase II and III published data suggested that licofelone is at least as effective as commercial NSAIDs, with an improved GI and CV safety profile (1, 10). Despite such favorable results, licofelone has not yet entered the market.

Various studies have been demonstrated that the gastric toxicity of nonselective NSAIDs may be related to their actions on the protective phospholipid layers of the gastric mucosa, particularly by the alteration of their biophysical properties (11-14). Thus, the objective of this work is to study the licofelone interactions with phospholipid bilayers to better understand its improved gastric tolerability. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) liposomes were used as model systems, since phosphatidylcholine is the main phospholipid of the human gastric mucosa (15) and it is in the fluid phase at physiological temperature (37 °C), as most phospholipids found *in vivo*. Moreover, the pH gradient found in the gastric mucosa, from the gastric lumen (pH ~2) to the epithelial cells (pH ~7) (16), was also considered. Thus, experiments were designed to be performed at pH 3.0, 5.0, and 7.4 to clarify the impact of media pH on licofelone-DMPC interactions.

Material and Methods

Materials

Licofelone [Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)]; 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) [Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)]; dimethyl sulfoxide (DMSO), Trizma® base, acetic acid [Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)]; formic acid [Merck & Co. (Kenilworth, NJ)]; methanol and chloroform [VWR International S.A.S. (Fontenais-sous-Bois, France)] were analytical grade or higher and used without further purification.

Formic acid, acetic acid, or Trizma® base were dis-

De facto, ensaios pré-clínicos e clínicos têm suportado a hipótese supracitada. Estudos em animais demonstraram a eficácia do licofelone como agente anti-inflamatório, analgésico, antipirético, antiagregante plaquetário, antiasmático e antiartrítico (1,6). Estudos pré-clínicos também indicaram que o licofelone é melhor tolerado no trato GI e no sistema cardiovascular (CV) que os AINEs (7-9). Com base nestes resultados, o licofelone entrou em ensaios clínicos para o tratamento da osteoartrite. Os escassos dados que foram publicados quanto à fase II e III destes ensaios clínicos sugeriam que o licofelone é pelo menos tão eficaz como os AINEs, mas com um perfil de segurança GI e CV superior (1,10). Apesar destes resultados favoráveis, o licofelone não foi comercializado até ao momento.

Tem vindo a ser demonstrado em vários estudos científicos que a toxicidade gástrica induzida pelos AINEs não seletivos está relacionada com os efeitos destes fármacos nas camadas protetoras de fosfolípidos da mucosa gástrica, particularmente através da alteração das propriedades biofísicas destas camadas (11-14). Neste sentido, neste estudo pretende-se estudar as interações do licofelone com bicamadas fosfolipídicas para clarificar os mecanismos inerentes à sua melhor tolerabilidade gástrica. Lipossomas constituídos por 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) foram utilizados como sistemas miméticos, já que a fosfatidilcolina é o fosfolípido mais abundante da mucosa gástrica humana (15) e, tal como a maioria dos fosfolípidos encontrados *in vivo*, está na fase fluida à temperatura fisiológica (37 °C). O gradiente de pH existente na mucosa gástrica, desde o lúmen gástrico (pH ~2) até às células epiteliais (pH ~7) (16), também foi considerado, já que as experiências foram desenhadas para avaliar a interação licofelone-DMPC a pH 3,0, 5,0 e 7,4.

Material e Métodos

Materiais

Licofelone [Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)]; 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) [Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)]; dimetil sulfoxido (DMSO), Trizma® base, ácido acético [Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)]; ácido fórmico [Merck & Co. (Kenilworth, NJ)]; metanol e clorofórmio [VWR International S.A.S. (Fontenais-sous-Bois, France)] foram obtidos pelo menos com pureza analítica e foram usados sem processos de purificação adicionais.

O ácido fórmico, o ácido acético ou o Trizma® base

solved in Milli-Q water to prepare formate (10 mM, pH 3.0), acetate (10 mM, pH 5.0), or Tris HCl (10 mM, pH 7.4) buffer. The pH of buffered solutions was adjusted with NaOH or HCl solutions (1 M).

Preparation of liposomes

Large unilamellar vesicles (LUVs) of DMPC were prepared by the lipid film hydration method followed by extrusion. Briefly, a lipid film was formed by evaporating the organic solvents to dryness, which was then hydrated with the appropriate buffer to yield multilamellar vesicles (MLVs). LUVs of DMPC were finally obtained by the extrusion of the previously obtained MLVs. Procedural details have been previously published (13).

Kinetic studies by UV-Vis spectrophotometry

The stability of licofelone was evaluated by temperature-controlled UV-Vis spectrophotometry. Increasing concentrations of DMPC LUVs (0 – 1,000 μM) were tested at pH 3.0, 5.0, and 7.4. An aliquot of a stock solution of licofelone in DMSO was added to a cuvette filled with buffered DMPC LUVs at 37.0 (\pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ and time was started. The temperature of the experiment was kept constant by using a thermostatted cell holder coupled with a circulating water bath. The final licofelone concentration and the final amount of DMSO were 15 μM and 1% (v/v) in all cases, respectively. Absorption spectra (220 - 400 nm) were acquired at 37.0 (\pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ under magnetic stirring at different time intervals in a UV/Vis spectrophotometer (Jasco V-660).

Prediction of pK_a and log D values

The acidity dissociation constant (pK_a) and the octanol:water log D ($\log D_{O/W}$) of licofelone were predicted using MarvinSketch calculator from Chemaxon. The pK_a value was calculated using the pK_a plugin while the logD plugin considering the consensus method was used to determine the $\log D_{O/W}$ of licofelone at pH 3.0, 5.0, and 7.4.

Results

The study of licofelone-DMPC interactions was initiated by the determination of the drug partition coefficient between the buffered medium and the lipid phase by derivative spectrophotometry. This experiment consists of acquiring the absorption spectra of licofelone with increasing concentrations of DMPC liposomes after an

foram dissolvidos em água Milli-Q para preparar as soluções tampão de formato (10 mM, pH 3,0), acetato (10 mM, pH 5,0) ou Tris HCl (10 mM, pH 7,4). O pH destes tampões foi ajustado com soluções de NaOH ou HCl (1 M).

Preparação de lipossomas

Vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC foram preparadas através do método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão. Sucintamente, preparou-se um filme lipídico através da evaporação de solventes orgânicos, o qual foi posteriormente hidratado com o tampão apropriado para se obterem vesículas multilamelares (MLVs). Os LUVs de DMPC foram finalmente obtidos pela extrusão da suspensão de MLVs. Os detalhes deste procedimento foram previamente publicados (13).

Estudos cinéticos por espectrofotometria UV-Vis

A estabilidade do licofelone foi avaliada por medidas de espectrofotometria UV/Vis realizadas a temperatura controlada. Concentrações crescentes de LUVs de DMPC (0 – 1000 μM) foram testadas a pH 3,0, 5,0 e 7,4. Uma alíquota de uma solução de licofelone em DMSO foi adicionada à cuvette contendo LUVs de DMPC a 37,0 (\pm 0,5) $^{\circ}\text{C}$ e o registo do tempo foi iniciado. Ao longo da experiência, a temperatura foi controlada pelo recurso a um suporte de cuvette termostaticado através da circulação de água aquecida. A concentração de licofelone testada foi 15 μM e a quantidade de DMSO foi 1% (v/v) em todos os casos. Espectros de absorção (220 - 400 nm) foram recolhidos a 37,0 (\pm 0,5) $^{\circ}\text{C}$ com agitação magnética em diferentes intervalos de tempo, usando um espectrofotómetro UV/Vis (Jasco V-660).

Determinação dos valores de pK_a e log D

A constante de dissociação ácida (pK_a) e o log D octanol:água ($\log D_{O/A}$) do licofelone foram determinados pelo recurso ao programa *MarvinSketch calculator* da Chemaxon. O valor de pK_a foi calculado utilizando o pK_a plugin. Já o $\log D$ plugin considerando o método consensos foi utilizado para determinado o $\log D_{O/A}$ do licofelone a pH 3,0, 5,0 e 7,4.

Resultados

O estudo das interações licofelone-DMPC iniciou-se pela determinação do coeficiente de partilha do fármaco entre o meio aquoso e a fase lipídica por espectrofotometria derivativa. Esta experiência consiste em adquirir os espectros de absorção do licofelone na presença de concentrações crescentes de lipossomas de DMPC após

incubation period (13, 17). Remarkable differences in the licofelone spectrum for the same DMPC concentrations at pH 7.4 or at pH 3.0 caught our attention and hampered the completion of the partition coefficient study. Thus, the licofelone stability was evaluated over time (0 to 150 min) at pH 3.0 in the presence of the smallest DMPC concentration (100 μM) used in derivative spectrophotometry experiments (Figure 2A). Licofelone was not stable at pH 3.0 in the presence of DMPC liposomes, since the well-defined absorption peaks of licofelone at 249 and 281 nm decreased in intensity and a new absorption band appeared around 325 nm over time (arrows, Figure 2A). The same spectral alterations were observed when other DMPC concentrations were tested (200, 500, and 1,000 μM). However, the absorbance variation at 281 and 325 nm, expressed as $A_0/A-1$, where A_0 is the initial absorbance of licofelone ($t = 0$ min), was dependent on the DMPC concentration (Figure 2B). As DMPC concentration increased, the spectral alterations occurred later and to a lesser extent.

um período de incubação (13,17). Diferenças notáveis no espectro de absorção do licofelone, para as mesmas concentrações de DMPC a pH 7,4 ou pH 3,0, chamaram a nossa atenção e impediram a conclusão do estudo do coeficiente de partilha. Assim, a estabilidade do licofelone foi avaliada ao longo do tempo (0 a 150 min) a pH 3,0 na presença da menor concentração de DMPC (100 μM) usada nos ensaios de espectrofotometria derivativa (Figura 2A). A degradação do licofelone a pH 3,0 na presença de lipossomas de DMPC foi notória, já que os picos de absorção do licofelone (249 e 281 nm) diminuíram de intensidade e uma nova banda de absorção apareceu a cerca de 325 nm ao longo do tempo (setas, Figura 2A). As mesmas alterações espectrais foram observadas quando outras concentrações de DMPC foram testadas (200, 500 e 1000 μM). No entanto, a variação da absorvência a 281 e 325 nm, expressa em $A_0/A-1$ em que A_0 é a absorvência inicial de licofelone ($t = 0$ min), dependia da concentração de DMPC (Figura 2B). À medida que a concentração de DMPC aumentava, as alterações espectrais ocorreriam mais tarde e em menor extensão.

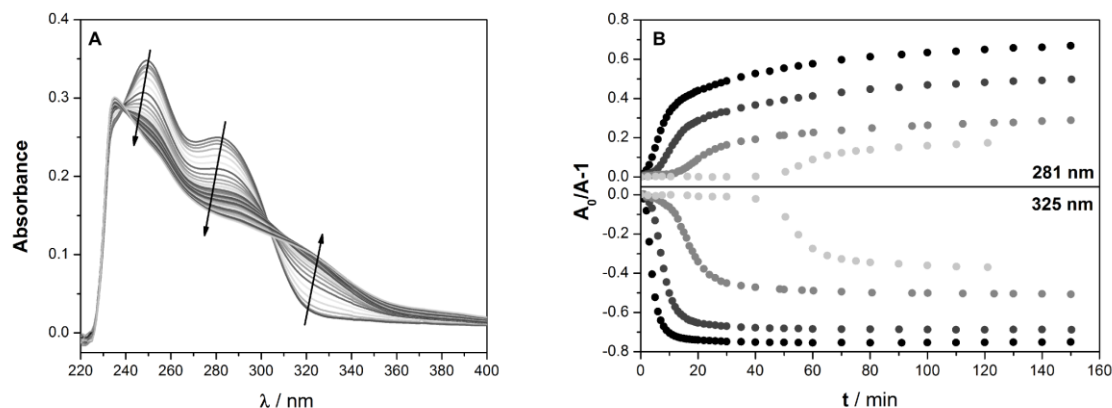


Figure 2/ Figura 2 - (A) Absorbance spectra of licofelone at pH 3.0 in the presence of DMPC LUVs (100 μM) as a function of time (0 - 150 min). Arrows highlight the main spectral alterations over time. (B) Licofelone absorbance variation, expressed as $A_0/A-1$, at 281 nm (upper graph) and 325 nm (lower graph), at pH 3.0 as a function of time and DMPC concentration [100 μM (black), 200 μM (dark gray); 500 μM (gray); 1000 μM (light gray)]/ (A) Espectro de absorção do licofelone a pH 3,0 na presença de LUV's de DMPC (100 μM) em função do tempo (0 - 150 min). As setas realçam as alterações espectrais principais ao longo do tempo. (B) Variação da absorvência do licofelone, expressa como $A_0/A-1$, a 281 nm (painel superior) e a 325 nm (painel inferior) a pH 3,0 em função do tempo e da concentração de DMPC [100 μM (preto), 200 μM (cinzento escuro); 500 μM (cinzento); 1000 μM (cinzento claro)].

Licofelone stability was similarly evaluated at pH 5.0 and 7.4 (Figure 3). At pH 5.0, the bathochromic shift observed at pH 3.0 over time was also verified (Figure 3A). It is notable that, for the same DMPC concentrations, the time-lag before spectral changes (t_{lag}) was longer at pH 5.0 than at pH 3.0. Moreover, the extent of licofelone degradation, expressed as the maximum variation of licofelone absorbance $[(A_0/A-1)_{max}]$, was lower at pH 5.0 than at pH 3.0 (Figure 4B). Furthermore, the licofelone degradation was also dependent on the DMPC concentration, since t_{lag} increased and $(A_0/A-1)_{max}$ decreased by increasing DMPC concentration at pH 3.0 and 5.0 (Figure 4).

At pH 7.4, no spectral alterations were observed for at least two hours with all DMPC concentrations tested (Figure 3B). It is noteworthy that licofelone degradation occurred within 30 minutes at pH 3.0 (Figure 2B), while it was not observed for four hours at pH 7.4 (Figure 3B) with the smallest DMPC concentration tested. Moreover, licofelone was stable in the absence of DMPC LUVs at pH 7.4 for 150 minutes. Due to solubility restrictions of licofelone in acidic media, the drug stability at pH 5.0 and 3.0 without liposomes could not be evaluated.

A estabilidade do licofelone foi avaliada de forma semelhante a pH 5,0 e 7,4. A pH 5,0 também se verificou o desvio batocrômico observado a pH 3,0 ao longo do tempo (Figura 3A). É importante ressaltar que, para as mesmas concentrações de DMPC, o intervalo de tempo decorrido antes das alterações espectrais se verificarem (t_{lag}) foi superior a pH 5,0 do que a pH 3,0. Mais ainda, a extensão da degradação do licofelone, expressa como a variação máxima da absorvência do licofelone $[(A_0/A-1)_{max}]$, foi inferior a pH 5,0 do que a pH 3,0 (Figura 4B). Além disso, a degradação do licofelone também foi dependente da concentração de DMPC, já que o t_{lag} aumentou e $(A_0/A-1)_{max}$ diminuiu à medida que a concentração de DMPC aumentou a pH 3,0 e 5,0 (Figura 4).

A pH 7,4 não foram observadas alterações espectrais durante pelo menos 2 h independentemente da concentração de DMPC testada (Figura 3B). É de notar que, para a menor concentração de DMPC testada, a degradação do licofelone ocorreu ao fim de 30 min a pH 3,0 (Figura 2B), mas não foi observada durante 4 h a pH 7,4 (Figura 3B). Além disso, não se verificou a degradação do licofelone na ausência de LUVs de DMPC a pH 7,4 durante 150 min. Devido às restrições de solubilidade do licofelone em meio ácido, não foi possível avaliar a estabilidade do fármaco na ausência de lipossomas a pH 5,0 e 3,0

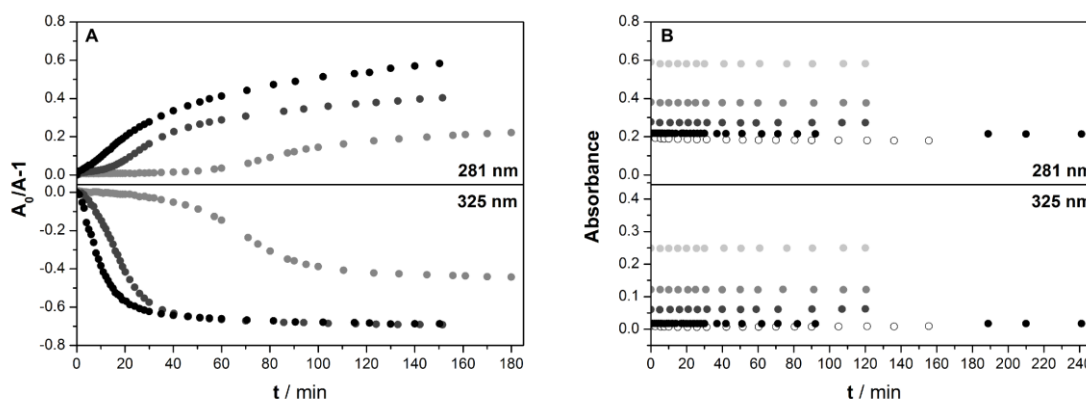


Figure 3/ Figura 3 - Licofelone absorbance variation at 281 nm (upper graph) and 325 nm (lower graph), at pH 5.0 (A) or 7.4 (B) as a function of time and DMPC concentration [0 (μ M) (white), 100 μ M (black), 200 μ M (dark gray); 500 μ M (gray); 1000 μ M (light gray)]. To improve clarity, the absorbance variation is expressed as $A_0/A-1$ for data at pH 5.0 and as absorbance for results at pH 7.4./ Variação da absorvência do licofelone a 281 nm (painel superior) e a 325 nm (painel inferior) e a pH 5,0 (A) ou 7,4 (B) em função do tempo e da concentração de DMPC [0 μ M (branco), 100 μ M (preto), 200 μ M (cinzento escuro); 500 μ M (cinzento); 1000 μ M (cinzento claro)]. Para facilitar a leitura, a variação da absorvência está expressa como $A_0/A-1$ para os dados a pH 5,0 e como absorvência para os resultados a pH 7,4.

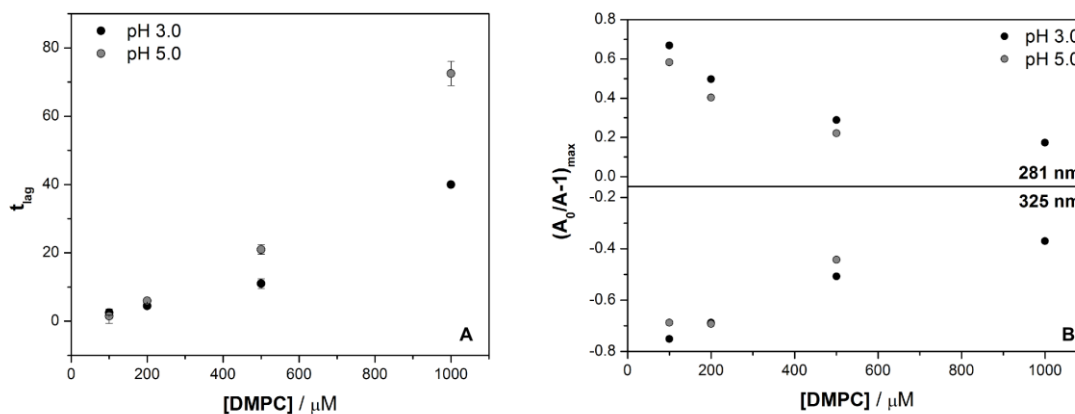


Figure 4/ Figura 4 - (A) Time-lag (t_{lag}) before initiation of licofelone degradation as a function of DMPC concentration and pH. (B) Maximum variation of licofelone absorbance, expressed as $(A_0/A-1)_{max}$, at 281 nm (upper graph) and 325 nm (lower graph) as a function of DMPC concentration and pH./ (A) Tempo de atraso (t_{lag}) antes do início da degradação do licofelone em função da concentração de DMPC e do pH. (B) Variação máxima da absorvência do licofelone, expressa como $(A_0/A-1)_{max}$, a 281 nm (painel superior) e a 325 nm (painel inferior) em função da concentração de DMPC e do pH.

Discussion

Biological membranes play key roles in diverse physiological and pathophysiological processes. Studies on understanding their structure and function, as well as their interactions with biological substances and xenobiotics have been increasing more and more in the last decades (18-20). In the context of medicinal chemistry, the evaluation of drug-membrane interactions is a valuable approach to fully understand the mechanisms of action and toxicity of biologically-active compounds (19, 20). These studies are particularly relevant for anti-inflammatory drugs as their efficacy and toxicity seem to be directly related to the drugs interaction with membrane lipids and proteins (11, 14, 21). Despite the information collected in the last decades, studies on drug-membrane interactions are often disregarded in drug discovery but they seem to be a promising strategy to improve the success rate of this laborious process, as previously suggested elsewhere (22, 23).

In this context, this study aimed at evaluating the interactions of a drug candidate (licofelone) with a membrane model made of a phosphatidylcholine (DMPC). In the first attempt to characterize these interactions, the data collected showed not only that licofelone is degraded in the presence of DMPC bilayers, but also that the rate and extent of degradation is dependent on pH and DMPC concentration.

Licofelone is an acidic drug and its pH-dependent degradation may be related to the drug ionization states.

Discussão

As membranas biológicas desempenham um papel preponderante em diversos processos fisiológicos e patofisiológicos. Estudos quanto ao entendimento da sua estrutura e função, assim como das suas interações com substâncias biológicas e xenobióticos têm aumentado mais e mais nas últimas décadas (18-20). No contexto da química medicinal, a avaliação das interações fármaco-membrana é uma estratégia valiosa para descrever na totalidade o mecanismo de ação e de toxicidade de compostos bioativos (19,20). Estes estudos são particularmente relevantes para fármacos anti-inflamatórios já que a sua eficácia e toxicidade parecem estar diretamente relacionadas com a interação destes fármacos com lípidos e proteínas membranares (11,14,21). Apesar da informação recolhida nas últimas décadas, os estudos de interação fármaco-membrana são ainda regularmente desconsiderados durante o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, estes parecem constituir uma estratégia interessante a adotar para melhorar a taxa de sucesso deste longo processo, tal como se sugeriu anteriormente (22,23).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar as interações de um fármaco em desenvolvimento (licofelone) com um modelo de membrana constituído por uma fosfatidilcolina (DMPC). Na primeira tentativa para caraterizar estas interações, os resultados obtidos demonstraram que o licofelone é degradado na presença de bicamadas de DMPC e que a velocidade e

The acidity dissociation constant (pK_a) of licofelone is 4.8, according to MarvinSketch calculator (Chemaxon). Licofelone degradation was faster and more extensive at lower pH values, at which the protonated form of licofelone was present. In turn, no spectral changes were observed for at least two hours at pH 7.4, at which the deprotonated and charged form of licofelone prevails. Therefore, it is conceivable that the neutral form of licofelone was the microspecies undergoing degradation. Licofelone degradation was also dependent on DMPC concentration. Interestingly, it was faster and in larger extent for lower DMPC concentrations. Predictions of the octanol:water $\log D$ ($\log D_{O/W}$) of licofelone suggested that this drug may have high affinity for phosphatidylcholine bilayers, since calculated $\log D_{O/W}$ was 5.72, 5.32, and 3.15 for pH 3.0, 5.0, and 7.4 (respectively) according to MarvinSketch calculator (Chemaxon). Since licofelone seems to have higher affinity to lipid media than to aqueous phases, it is plausible that the drug will concentrate in phosphatidylcholine bilayers. The lower the DMPC concentration, the higher the local concentration of drug inside the phospholipid bilayers, which seems to favor the occurrence of licofelone degradation concerning both rapidity and efficacy. Thus, it is possible that more than one licofelone molecule must collide for the degradation to occur, justifying the slower rate and extent of licofelone degradation as DMPC concentration increases and licofelone becomes more diluted in the lipid phase. The DMPC bilayer may act as a catalyst not only by concentrating the drug molecule, but also by furnishing a favorable chemical environment for the degradation to occur.

One possible hypothesis for the degradation mechanism of licofelone may comprise the formation of anhydride dimers of licofelone, in a similar fashion as described for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and dialkylmaleic acids (24, 25). This seems to be a reasonable possibility for two main reasons: a) the unionized acid is the active species of anhydride formation (25) and the degradation of licofelone was favored at lower pH; and b) the higher the local concentration of licofelone in DMPC bilayers (lower lipid concentration), the higher the probability of two carboxylic acids from two different licofelone molecules to collide, increasing the velocity and the extent of licofelone degradation, as observed herein. Further investigations are awaited to confirm the suggested mechanism by completing the structural elucidation of the products formed upon licofelone degradation.

As this is a biomimetic study, the overall complexity of the biological membranes is not considered in this work. Future work is warranted to verify if the li-

a extensão da degradação é dependente do pH do meio e da concentração de DMPC.

O licofelone é um composto ácido e sua degradação dependente do pH pode estar relacionada com os seus estados de ionização. A constante de acidez (pK_a) do licofelone é 4,8, de acordo com o cálculo efetuado no software MarvinSketch (Chemaxon). A degradação do licofelone foi mais rápida e em maior extensão para valores mais baixos de pH, nos quais a forma protonada do licofelone estava presente. Por sua vez, não foram observadas alterações espectrais por pelo menos 2 h a pH 7,4, valor de pH no qual prevalece a forma desprotonada e carregada do licofelone. Portanto, é concebível que a forma neutra do licofelone seja a microespécie a sofrer degradação.

Adicionalmente, a degradação do licofelone foi dependente da concentração de DMPC. Curiosamente, esta foi mais rápida e em maior extensão para concentrações mais baixas de DMPC. As previsões de $\log D$ no sistema octanol:água ($\log D_{O/A}$) do licofelone sugeriram que este fármaco pode ter alta afinidade pelas bicamadas de fosfatidilcolina, uma vez que os valores calculados foram 5,72, 5,32 e 3,15 para pH 3,0, 5,0 e 7,4 (respectivamente), de acordo com o cálculo efetuado no *software* MarvinSketch (Chemaxon). Como o licofelone parece ter maior afinidade para o meio lipídico do que para a fase aquosa, é plausível que o fármaco se concentre nas bicamadas da fosfatidilcolina. Quanto menor a concentração de DMPC, maior a concentração local de fármaco nas bicamadas fosfolipídicas, o que parece favorecer a ocorrência da degradação do licofelone quanto à sua rapidez e eficácia. Assim, é possível que a degradação ocorra através da colisão de mais do que uma molécula de licofelone, justificando o facto da velocidade e a extensão da degradação serem mais lentas à medida que a concentração de DMPC aumenta e o licofelone se dilui na fase lipídica. Assim sendo, a bicamada de DMPC pode atuar como um catalisador, não apenas pelo aumento da concentração local do fármaco, mas também pela criação de um ambiente químico favorável para a degradação.

Uma hipótese possível para o mecanismo de degradação do licofelone poderá consistir na formação de dímeros anidrido do licofelone, de uma forma semelhante ao descrito para o ácido naftaleno-1,8-dicarboxílico e para os ácidos dialquilmaleico (24,25). Esta parece ser uma hipótese provável por duas razões: a) o ácido protonado é a espécie ativa da formação de anidrido (25) e a degradação de licofelone foi favorecida a pH baixo; e b) quanto maior a concentração local de licofelone na bicamada de DMPC (concentração lipídica baixa), maior será a probabilidade de colisão de dois ácidos

cofelone degradation occurs in the presence of other membrane lipids and membrane proteins by performing *in vitro* studies with more complex membrane models and with cell cultures.

Despite these limitations, this study highlights the importance of considering membrane lipids on the early stages of drug development. Beyond providing information about the drugs mode of action and toxicity mechanisms, as previously described for various anti-inflammatory drugs (11-14, 21-23, 26), this study also showed that the evaluation of drug-membrane interactions may also be useful to assess the stability of drug candidates in biologically-relevant media, avoiding setbacks in later stages of drug development.

Conclusions

The preliminary data regarding the characterization of licofelone-DMPC interactions is presented herein. To our knowledge, this is the first report on the pH-sensitive degradation of licofelone in liposome:water systems. This information is particularly relevant if this drug is intended to be administered orally, as licofelone may undergo degradation in the stomach due to the acidic conditions of the gastric lumen. In the gastric mucosa, the presence of external phosphatidylcholine layers may even increase the rate and the extent of licofelone degradation. Thus, the licofelone administration in gastro-resistant formulations may be a useful way to avoid the drug degradation *in vivo*.

Although licofelone data seem to support the multiple target strategy to improve the anti-inflammatory therapy, a long journey is still ahead to fully characterize the impact of concomitantly inhibiting COX and 5-LOX in the *in vivo* eicosanoids biosynthesis, as well as its consequences in terms of toxicity, contraindications, and pharmacological interactions during the short and long-term therapy of inflammatory conditions.

Overall, this study contributes to this pathway by highlighting the urgency of considering lipids in drug development to further understand drugs stability in bio-

carboxílicos provenientes de moléculas de licofelone diferentes, aumentando assim a velocidade e a extensão da degradação. O mecanismo de degradação do licofelone terá de ser confirmado no futuro através da elucidação estrutural dos produtos de degradação.

Como se trata de um estudo biomimético, a complexidade global das membranas biológicas não foi considerada neste trabalho. No futuro, será então necessário confirmar se a degradação do licofelone também ocorre na presença de outros lípidos e proteínas membranares pelo recurso a estudos *in vitro* com modelos de membrana mais complexos e pelo recurso a linhas celulares. Apesar destas limitações, este trabalho salienta a importância de considerar os lípidos membranares nas fases iniciais do desenvolvimento de novos fármacos. Para além de fornecer informação quanto aos mecanismos de ação e de toxicidade, tal como descrito para vários anti-inflamatórios (11-14,21-23,26), os estudos de interação fármaco-membrana também podem ser uma mais-valia para avaliar a estabilidade dos compostos em meios biologicamente relevantes. Desta forma, poderão constituir um meio para evitar contratempos nas fases mais avançadas do desenvolvimento de novos fármacos.

Conclusões

Os dados preliminares quanto à caracterização das interações licofelone-DMPC são apresentados neste trabalho. Segundo conseguimos apurar, este é a primeiro descrição da degradação sensível ao pH do licofelone em sistemas lipossoma:água. Esta informação é particularmente relevante no caso deste fármaco ser administrado por via oral, pois o licofelone pode sofrer degradação no estômago devido às condições ácidas do lúmen. Na mucosa gástrica, a presença de camadas externas de fosfatidilcolina pode ainda aumentar a velocidade e a extensão da degradação do licofelone. Assim, a administração de licofelone em formulações gastroresistentes pode ser uma mais-valia para evitar a degradação do fármaco *in vivo*.

Apesar dos resultados obtidos com o licofelone suportarem a estratégia dos alvos múltiplos para melhorar a terapia anti-inflamatória, um longo caminho está ainda por percorrer para caracterizar na totalidade o impacto de inibir concomitantemente a COX e a 5-LOX na biossíntese de eicosanóides *in vivo* e para avaliar as suas consequências a nível da toxicidade, contraindicações e interações farmacológicas ao longo da terapia aguda e crónica das condições inflamatórias.

No geral, este trabalho consiste em mais um passo deste

logically relevant media. The evaluation of drug-lipid interactions in the early stages of drug development may avoid important setbacks during clinical evaluation, decreasing the financial and biological costs of this process.

Acknowledgements

This work received financial support from: PT national funds (FCT/MCTES, Fundação para a Ciência e a Tecnologia and Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) [Grant: UID/QUI/50006/2019]; FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia), POCH (Programa Operacional Capital Humano) and EU (European Union) [Grants: SFRH/BD/109621/2015 and IF/00293/2015]; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [Grants: 160446/2013-9 and Proc. 301250/2013-8]; FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) [Projeto Temático 2013/08166-5]; INCT-FCx (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos).

Conflict of interests

The authors declare that there is no financial or personal relationship that represents any potential conflict of interests.

caminho, destacando a urgência de considerar os lipídios no desenvolvimento de novos fármacos para entender na totalidade a estabilidade dos compostos em meios biologicamente relevantes. A avaliação das interações fármaco-lípido nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos pode evitar transtornos importantes durante a fase clínica, diminuindo os custos financeiros e biológicos deste processo.

Agradecimentos

Agradece-se o apoio financeiro obtido através de: fundos nacionais portugueses (FCT/MCTES, Fundação para a Ciência e a Tecnologia e Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) [Financiamento: UID/QUI/50006/2019]; FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia), POCH (Programa Operacional Capital Humano) e UE (União Europeia) [Financiamento: SFRH/BD/109621/2015 e IF/00293/2015]; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [Financiamento: 160446/2013-9 e Proc. 301250/2013-8]; FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) [Projeto Temático 2013/08166-5]; INCT-FCx (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não existir nenhuma relação pessoal ou financeira que possa configurar uma situação de possível conflito de interesses.

References / Referências

1. Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK, Cuccovia IM, Reis S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Med Res Rev.* 2017; 37(4):802-59.
2. Koeberle A, Siemoneit U, Buhning U, Northoff H, Laufer S, Albrecht W, et al. Licofelone suppresses prostaglandin E2 formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326(3):975-82.
3. Fischer L, Hornig M, Pergola C, Meindl N, Franke L, Tanrikulu Y, et al. The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol.* 2007; 152(4):471-80.
4. Tries S, Neupert W, Laufer S. The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res.* 2002; 51(3):135-43.
5. Cicero AF, Laghi L. Activity and potential role of licofelone in the management of osteoarthritis. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(1):73-9.
6. Tries S, Laufer S. The pharmacological profile of ML3000: A new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Inflammopharmacology.* 2001; 9(1):113-24.
7. Rotondo S, Dell'Elba G, Manarini S, Cerletti C, Evangelista V. The lipoxygenase-cyclooxygenase inhibitor licofelone prevents thromboxane A2-mediated cardiovascular derangement triggered by the inflammatory peptide fMLP in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 2006; 546(1-3):95-101.
8. Moreau M, Daminet S, Martel-Pelletier J, Fernandes J, Pelletier JP. Superiority of the gastroduodenal safety profile of licofelone over rofecoxib, a COX-2 selective inhibitor, in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005; 28(1):81-6.
9. Wallace JL, Carter L, McKnight W, Tries S, Laufer S. ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur J Pharmacol.* 1994; 271(2-3):525-31.
10. Kulkarni SK, Singh VP. Licofelone--a novel analgesic and anti-inflammatory agent. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7(3):251-63.
11. Pereira-Leite C, Nunes C, Reis S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: In vitro assessment and relevance for their biological actions. *Prog Lipid Res.* 2013; 52(4):571-84.
12. Lichtenberger LM, Zhou Y, Jayaraman V, Doyen JR, O'Neil RG, Dial EJ, et al. Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids.* 2012; 1821(7):994-1002.
13. Pereira-Leite C, Nunes C, Grahl D, Bozelli JC, Schreier S, Kamma-Lorger CS, et al. Acemetacin-phosphatidylcholine interactions are determined by the drug ionization state. *Phys Chem Chem Phys.* 2018; 20(21):14398-409.
14. Manrique-Moreno M, Heinbockel L, Suwalsky M, Garidel P, Brandenburg K. Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1858(9):2123-31.
15. Nardone G, Laccetti P, Civiletti C, Budillon G. Phospholipid composition of human gastric mucosa: a study of endoscopic biopsy specimens. *Gut.* 1993; 34(4):456-60.
16. Bahari HM, Ross IN, Turnberg LA. Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut.* 1982; 23(6):513-6.
17. Magalhaes LM, Nunes C, Lucio M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nat Protoc.* 2010; 5(11):1823-30.
18. Casares D, Escribá PV, Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9):2167.
19. Lopes D, Jakobtorweihen S, Nunes C, Sarmento B, Reis S. Shedding light on the puzzle of drug-membrane interactions: Experimental techniques and molecular dynamics simulations. *Prog Lipid Res.* 2017; 65:24-44.
20. Lucio M, Lima JLFC, Reis S. Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. *Curr Med Chem.* 2010; 17(17):1795-809.
21. Gaspar D, Lucio M, Rocha S, Lima JLFC, Reis S. Changes in PLA(2) activity after interacting with anti-inflammatory drugs and model membranes: evidence for the involvement of tryptophan residues. *Chem Phys Lipids.* 2011; 164(4):292-9.
22. Pereira-Leite C, Nunes C, Bozelli JC, Jr., Schreier S, Kamma-Lorger CS, Cuccovia IM, et al. Can NO-indomethacin counteract the topical gastric toxicity induced by indomethacin interactions with phospholipid bilayers? *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018; 169:375-83.
23. Pereira-Leite C, Lopes-de-Campos D, Fontaine P, Cuccovia IM, Nunes C, Reis S. Licofelone-DPPC Interactions: Putting Membrane Lipids on the Radar of Drug Development. *Molecules.* 2019; 24(3):516.
24. Barros TC, Yunes S, Menegon G, Nome F, Chaimovich H, Politi MJ, et al. Hydrolysis of 1,8- and 2,3-naphthalic anhydrides and the mechanism of cyclization of 1,8-naphthalic acid in aqueous solutions. *J Chem Soc, Perkin Trans 2.* 2001; (12):2342-50.
25. Ebersson L, Welinder H. Cyclic anhydrides. III. Equilibrium constants for the acid-anhydride equilibrium in aqueous solutions of certain vicinal diacids. *J Am Chem Soc.* 1971; 93(22):5821-6.
26. Pereira-Leite C, Nunes C, Lima JL, Reis S, Lucio M. Interaction of Celecoxib with Membranes: The Role of Membrane Biophysics on its Therapeutic and Toxic Effects. *J Phys Chem B.* 2012; 116(46):13608-17.

Supplements | Suplementos

The Fascination of Plants Day (only available online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.216

Dia do Fascínio das Plantas (apenas disponível online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.216

1st Bioactive Natural Products Research Meeting (only available online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.217

I Reunião de Investigação de Produtos Naturais Bioativos (apenas disponível online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.217

Proceedings of the Physioma 2019 – The 1st International Meeting of the Portuguese Society of Physiology (only available online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.218

1º Encontro Internacional da Sociedade Portuguesa de Fisiologia, realizado em Lisboa, em Outubro - ISCTE IUL (apenas disponível online) DOI.org/10.19277/bbr.16.2.218

CBIOS - the Lusofona's Research Center for Bioscience and Health Technologies, Science Sessions synopsis (only available online) DOI: 10.19277/bbr.16.2.219

Atas das Sessões Científicas do CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusofona (apenas disponível on-line) DOI: 10.19277/bbr.16.2.219



Subscription Terms

Biomedical and Biopharmaceutical Research

Journal de Investigaçã
Biomédica e Biofarmacéutica

Send this information in an closed envelope to:

ALIES BBR Secretariat
Campo Grande 376 - 1749-024 Lisboa

Name _____ Age _____ Address _____
 _____ Zip Code _____ Tel _____
 Fax _____ Mobile _____ Email _____
 Workplace _____
 Specialty _____
 Performed function _____

I want to formalize my signature of BBR for a period of: (indicate with X) 1 Year (35 Euros) 2 Years (70 Euros)
 I send to endorsed to ALIES

Cheque n° _____ on the Bank _____

Data Accounting for the Effects of Issuance of Receipts:

Designation _____
 Address _____
 Tax No. _____ Date and Signature _____

Journal Subscription Form

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÉUTICA

Contents / Conteúdos

- 154 **Anthropometric evaluation of children aged between 3 and 9 years from the Canary Islands**
Avaliação antropométrica de crianças entre 3 e 9 anos de idade das ilhas Canárias
Crista Ferreira-Pêgo, Elizabeth Galván, Sílvia Morales, Joaquim Fábregas, Yazmina Martín & Nelson Tavares
- 165 **Anthropometric evaluation of pre-school age children from Azores archipelago, Portugal**
Avaliação antropométrica de crianças com idade pré-escolar e escolar do arquipélago dos Açores, Portugal
Crista Ferreira-Pêgo, Ana Carrapa, Sara Galvão, Tânia Ferece, Raquel Martins, Tiago Dias, Frederico Viveiros, Rita Carvalho, Rui César & Nelson Tavares
- 176 **Body shape concerns in Portuguese university students**
Preocupação com a forma física em estudantes universitários portugueses
Crista Ferreira-Pêgo, Adriana Costa, Joana Rodrigues & Bruno Sousa
- 184 **Food allergy (Clinical Case)**
Alergia alimentar (Caso clínico)
Arlana Samira & António Raposo
- 188 **Texture analysis is a useful tool to characterize the cutaneous biomechanical profile**
A análise de textura é uma ferramenta útil para caracterizar o perfil biomecânico cutâneo
Henrique Silva, Francisco Rego, Rafaela Francisco & L. Monteiro Rodrigues
- 195 **Studying the human lower limb perfusion dynamics with the step in place model**
Estudo da perfusão dinâmica no membro inferior humano, com o modelo "step in place"
Marjorilda Florinda, Sérgio Nuno & L. Monteiro Rodrigues
- 202 **Safety signals assessed by the pharmacovigilance risk assessment committee: biologics vs conventional medicines**
Sinais de segurança analisados pelo comité de avaliação do risco em farmacovigilância: biológicos vs terapêutica convencional
Marjorilda Estudante, Teresa Lopes & Dinah Duarte
- 213 **Physico-mechanical properties of topical formulations based on different polymers**
Propriedades físico-mecânicas de formulações tópicas à base de diferentes polímeros
Victor Hugo Pacagnelli Infante, Lívia Salomão Callizo & Patrícia Maia Campos
- 223 **Phosphatidylcholine bilayers trigger the degradation of licoferone**
As bicamadas de fosfatidilcolina induzem a degradação do licofelone
Catarina Pereira-Lima, Cláudia Nunes, Isabela Caccetta & Saldete Reis
- 234 **Supplement | Suplemento**
- The Fascination of Plants day
 - Dia do Fascínio das Plantas
 - 1st Bioactive Natural Products Research Meeting
 - 1^o Reunião de Investigação de Produtos Naturais Bioactivos
 - Proceedings of the PhysioMa 2019 - The 1st International Meeting of the Portuguese Society of Physiology
 - 1^o Encontro Internacional da Sociedade Portuguesa de Fisiologia
 - CBIOS - The Lusófona's Research Center for Biomedicine and Health Technologies, Science Sessions synopsis
 - Atas das Sessões Científicas do CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona