Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Luís Monteiro Rodrigues

Editor

Editorial

Vol 17: Number 1
(Vol 17: Número 1)
10.19277/bbr.17.1.e

BBR 17.1

A new era starts here

As we have announced during the last months, 2020 is the year for full open access of the Biomedical and Biopharmaceutical Research journal. A longtime objective is now fulfilled, and it is an evolutionary landmark intending to reach another level of organization and consolidation. To reach this point, a great deal of work was done by a small but dedicated team within the BBR.

At this time, we remind ourselves of our independent character, separate from any editorial or industry group, exclusively rooted in the science and education world, and under a non-profit frame. Additionally, it is important to remember that we are wholeheartedly dedicated to the growth of scientific culture thought made real in our common mother-language within the wide "Lusophone" space. These were the founding purposes, and through them we have been supporting many institutions and individuals, especially in Portugal and Brasil, acting as a "window" that has been expanding since our inception. Our journal is, in fact, already an extraordinary science network, Portuguese – based but currently involving other institutions and individuals from all over the world. Nearly all our published papers reveal original research, most often developed under partnership. Our publication shift is a relevant attribute effectively contributing to the advancement of knowledge, impacting researchers, institutions, communities and cultures.

It is not easy to gather editors from very different origins, cultural background, and experiences, but our resulting quality evolution is obvious. We are committed to continuing these objectives, without forgetting our founding principles.

The open access of BBR is a determinant milestone. Furthermore, our editorial policy is also in progress, being more adapted to the current future, more attractive, and surely more demanding not only for authors but also for editors and peer-reviewers. We are in fact entering a new era, a new consolidation phase to reach higher quality standards.

Thank you to all who, in different forms, made this possible. We are deeply grateful for your generous contributions, and we look forward to working together for a bright future.

L Monteiro Rodrigues
Editor

Uma nova era a começar

Conforme foi amplamente anunciado nos últimos meses, 2020 é o ano de acesso aberto e total para o nosso Jornal de Investigação Biomedica e Biofarmacêutica (JIBB). Um objetivo há muito definido, e agora cumprido. Um marco evolucionário que representa a nossa determinação em alcançar outro nível de organização e consolidação para este projecto. Para chegar a este ponto, muito foi feito por um grupo pequeno mas muito dedicado ao progresso do JIBB.

Devemos ter presente o nosso caráter independente, de qualquer grupo editorial ou industrial. Somos um projeto exclusivamente enraizado no mundo da ciência e da educação, numa lógica desprovida de fins lucrativos. Igualmente importante, sentimo-nos assumidamente dedicados ao desenvolvimento do pensamento e da cultura científica que concretizamos na nossa língua materna comum, no amplo espaço "lusófono". Esses foram os propósitos fundadores e, através deles, apoiamos muitas instituições e indivíduos, especialmente em Portugal e no Brasil, atuando como uma "janela" que vem se alargando. Na verdade, o nosso jornal já é em si mesmo uma rede científica extraordinária, assentando no "português" como base comum, mas envolve na actualidade muitas outras instituições e indivíduos de todo o mundo. Praticamente todos os nossos artigos publicados revelam investigação original, principalmente desenvolvidas em parceria. Este é um marco relevante que contribui efetivamente para o avanço do conhecimento, impactando pesquisadores, instituições, comunidades e culturas.

Não é fácil reunir editores de diferentes origens culturais e experiências. Contudo, a evolução da nossa qualidade é inegável. E estamos comprometidos em continuar a concretizar esses objetivos, sem esquecer os nossos princípios fundamentais.

O acesso aberto é um marco determinante. Além disso, a nossa política editorial também está em andamento, sendo mais adaptada ao futuro atual, mais atraente e certamente mais exigente, não apenas para os autores, mas também para os editores e revisores. Efectivamente, o JIBB está a entrar numa nova era, numa nova fase de consolidação para alcançar outros níveis de maior qualidade.

Obrigado a todos aqueles que, de diferentes formas, tornaram tudo isto possível. Aqui expressamos a nossa profunda gratidão pela generosidade das Vossas contribuições, e aguardamos com grande esperança e expectativa, os resultados deste esforço conjunto para um futuro melhor.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Nut. Food Sciences | C. Nut. Alimentação Biomed Biopharm Res., 2020; 17(1): 2-11

doi: 10.19277/bbr.17.1.220

Factors influencing healthy food choices of university students

Fatores que influenciam a escolha de comida saudável nos estudantes universitários

Bruno Sousa [1], Cíntia Ferreira-Pêgo [1], Catarina Alves Pacheco [2], Carolina Pereira [2], Mariana Batalha [2], Tânia Santos [2], Rita Vitorino de Carvalho [3]*

[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, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal; [3]ECEO – ULHT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

* Corresponding author: rita.carvalho@ulusofona.pt

Abstract

Healthy foods should be available to anyone, especially young adults at educational institutions. University students can suffer a lack of preoccupation with their health and consequently also present unhealthy food choices, due to the adaptation of a new environment, study stress, lack of proper time management, and busy class schedules.
This study consisted of two cross-sectional observational analyzes, in which students were randomly recruited from the university, and data was obtained through the Computer-aided web interviewing survey method, through a web-based questionnaire. The sample included 584 participants, 297 from 2018 and 287 from 2019.
The preference and choice for a healthy snack bar in university facilities seem to be conditioned mainly by the price of meals, as most students mentioned this as the main condition of their choice, both in 2018 and 2019. In this sense, most respondents report that only "sometimes" would they be willing to pay more than usual or travel a longer distance, to dine in a healthier snack bar.
We conclude that the factor that most influences the choice of healthy food is the price, but there is a higher demand and consumption trend for healthy food in young college students.

Keywords: Food choice, consumption trends, healthy food, behaviors, university students

Resumo

Alimentos saudáveis deveriam estar disponíveis para qualquer pessoa, especialmente para jovens adultos nas suas instituições de ensino. Devido à adaptação a um novo ambiente, stress provocado pelo estudo, falta de gestão adequada do tempo e horários ocupados pelas aulas, os estudantes universitários podem sofrer de falta de preocupação com a sua saúde e, consequentemente, também apresentar escolhas alimentares pouco saudáveis.
Este estudo consistiu em duas análises observacionais transversais. Os estudantes foram recrutados aleatoriamente na universidade, e os dados foram obtidos através do método de pesquisa Computer-aided web interviewing, através de um questionário enviado pela web.
A amostra final incluiu 584 participantes, sendo que 297 são procedentes da análise de 2018 e 287 de 2019.
A preferência e escolha por um bar mais saudável nas instalações universitárias, parece ser condicionada, sobretudo, pelo preço das refeições, já que a maioria dos estudantes referiu esta como a principal condicionante da sua escolha, tanto em 2018, como em 2019. Neste sentido, a maioria dos inquiridos refere que só "às vezes" estaria disposto a pagar mais do que o habitual, ou percorrer uma maior distância, para efetuar as suas refeições num bar saudável.
Concluímos que o fator que mais influencia a escolha de comida saudável é o preço, contudo parece existir uma maior procura, preocupação e tendência de consumo por comida saudável nos jovens universitários.

Palavras-chave: Escolha alimentar, tendências de consumo, comida saudável, comportamentos, estudantes universitários

Received / *Recebido*: 07/11/2019
Accepted / *Aceite*: 10/02/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Healthy foods, like fruits, vegetables, legumes, and nuts, among others, should be available to anyone, especially young people, for example at the school level (1). In the National Program for the Promotion of Healthy Eating, one of the action plans for 2018-2019 was the "Modification of food supply in certain public spaces (including higher education institutions)" and for 2019-2020: "Contribute technically to the implementation of a simplifying nutrition labeling system"(4). Thus, schools and universities should be able to encourage young people to choose higher quality food products by promoting certain menu changes (2).

Today it is known that young consumers are well informed about the products they eat (3) and also have become more aware of the foods they chose both at home and away from home (4). Increasingly interested in adhering to a healthy diet, young people are progressively opting for more complete food products, both in terms of their nutritional value, as well as their origin, the form of production, including locally grown and organically grown produce, the composition, and the healthiness of the food product (5,6). Conscientious consumers value personal health and are sensitive to the effects of food products (5). Young people also place progressively greater attention on the quality of a product. In addition to the quality parameter of a food product, other factors influence young people's choices, namely economic (7), social, and personal taste (3) factors.

However, due to the adaptation of a new environment, study stress, lack of proper time management and busy class schedules, these university students can suffer a lack of concern about their own health and consequently also present unhealthy food choices (8,9). The presence of healthy restaurants in the university campus could be a possible way to prevent these unhealthy patterns. Taking this into consideration, the main aim of the present study was to describe the factors that may influence the choice for a healthy restaurant in the university campus, as well as the trends in healthy food consumption among university students from the Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) in Lisbon, Portugal.

Introdução

Uma alimentação saudável deveria estar ao alcance de qualquer pessoa, principalmente dos mais jovens, por exemplo a nível das instituições educativas (1). No Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável, um dos planos de ações para 2018-2019 é a "Modificação da oferta alimentar em determinados espaços públicos (instituições do ensino superior)" e para 2019-2020: "Contribuir tecnicamente para a implementação de um sistema de rotulagem nutricional simplificativo" (2).

Hoje em dia sabe-se que o jovem consumidor está bem informado no que toca aos produtos que ingere (3), tanto em casa como fora dela (4).

Tendo cada vez mais interesse na adesão a uma dieta saudável, os jovens optam progressivamente por produtos alimentícios mais completos, quer no que toca ao seu valor nutricional, assim como, à origem, à forma de produção do produto, incluindo produtos cultivados localmente e organicamente, à composição, e à salubridade do produto alimentício (5, 6). O tipo de consumidor consciente valoriza a saúde pessoal e é sensível aos efeitos dos produtos alimentícios (5). Os jovens colocam ainda, uma atenção progressivamente maior na qualidade de um produto. Além do parâmetro de qualidade de um produto alimentício, existem ainda outros fatores que influenciam as escolhas dos jovens, sendo eles fatores económicos (7), sociais e o gosto pessoal (3).

No entanto, devido à adaptação a um novo ambiente, stress provocado pelo estudo, falta de gestão adequada do tempo e horários ocupados pelas aulas, os universitários podem sofrer uma falta de preocupação com a própria saúde e, consequentemente, também apresentar escolhas alimentares pouco saudáveis (8, 9). A presença de restaurantes saudáveis no campus da universidade poderá ser uma forma possível de evitar esses padrões prejudiciais. Tendo em consideração todos estes fatores, o principal objetivo do presente estudo foi descrever os fatores que podem influenciar a escolha de um restaurante saudável no campus da universidade, bem como as tendências no consumo de alimentos entre estudantes universitários da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) em Lisboa, Portugal.

Material and Methods

Design and study population

The present study consists of two cross-sectional observational analyses to evaluate the habits, preferences, and choices about the dining facilities existing at the university campus of the ULHT. Participants (> 18 years old) were randomly recruited from this university, all were students from a wide range of academic courses, from architecture and engineering, to health sciences, such as nutrition, veterinary, sports or psychology. The effective sample size of the present study was 584 participants, 297 coming from the 2018 analysis and 287 coming from the cross-sectional assessment performed during 2019.

Habit assessment and consumption preference

Secondary data was searched using indexed scientific databases and a program from the Portuguese Ministry of Health. Primary data was obtained through a computer-aided web interviewing survey method, in which the respondent completed the questionnaire through a web link. Data collection was performed using a structured questionnaire, composed of four sections. In the first and second sections, the personal characteristics and the course attended were collected. The third section explored the eating habits, how daily meals were consumed, the average time to consume them, and the monetary expenditure each respondent made per day in snack bars or canteens. The fourth section looked at the trend toward eating healthy food in university snack bars, specifically, the types of foods likely to be chosen , willingness to travel further, , and the willingness to pay more for healthy options.

At the evaluated university campus facilities, the students have available three restaurants: two of them presenting traditional Portuguese food ("A Cantina" and "Xiribitátá") and one presenting healthy food options, including homemade meals, vegan, vegetarian, lower fat/carb/ processed ingredients, , etc. ("100 Corantes").

Statistical analysis

Data are presented either as means and standard deviation (SD) for continuous variables or numbers and percentages for dichotomous variables. All analyses were performed using SPSS version 26.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL).

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo consiste em duas análises observacionais transversais com o objetivo de avaliar os hábitos, preferências e escolhas sobre as instalações de restauração existentes no campus universitário da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), Lisboa (Portugal). Os participantes (>18 anos) foram recrutados aleatoriamente na universidade, e são estudantes dos mais variados cursos académicos, desde arquitetura, passando por engenharias e terminando nas áreas da saúde, como nutrição, veterinária, desporto ou psicologia. O tamanho efetivo da amostra do presente estudo foram 584 participantes, sendo que 297 são procedentes da análise de 2018 e 287 são procedentes da avaliação transversal realizada durante o ano 2019.

Avaliação de hábitos e preferência de consumo

Para obter o resultado do estudo, a pesquisa de dados secundários foi efetuada com recurso a base de dados científicas indexadas e programa do Ministério da Saúde de Portugal. Os dados primários foram obtidos através do método de pesquisa Computer-aided web interviewing, em que o respondente preenche o questionário através de um link enviado pela web. A recolha de dados foi realizada por meio de um questionário estruturado, composto por quatro seções. Na primeira e segunda seção, foram recolhidas as características pessoais e o curso frequentado. A terceira seção explorou os hábitos de refeição, as formas de consumo das refeições diárias, o tempo, em média, para as consumir, e o dispêndio monetário que cada respondente efetuou por dia, nos bares ou cantina. A quarta seção analisou a tendência de consumo de comida saudável nos bares da universidade, os tipos de alimentos que escolheria, se estaria disposto a percorrer uma distância maior para os consumir e a predisposição de pagar mais por este tipo de alimentos.

Nas instalações universitárias avaliadas, os alunos têm à sua disposição 3 restaurantes: 2 deles apresentando comida tradicional portuguesa ("A Cantina" e "Xiribitátá") e 1 deles apresentando opções de alimentação saudável, como por exemplo refeições caseiras, vegan, vegetariano, baixo em gordura/ hidratos de carbono/ ingredientes processados, etc. ("100 Corantes").

Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou números e percentagens para variáveis dicotómicas. Todas as análises

Results

A total of 584 students, 229 of whom were men and 355 women, participated in the present analyses. The general characteristics of the population according to the years in which the surveys were conducted (2018 vs. 2019) are summarized in Table 1. Most of the individuals surveyed in 2018 were aged between 20 and 25 years (70.40%), were women (62.60%), Portuguese (57.20%) and mainly from health science courses (41.40%). Very similar results were obtained in 2019, except for the origin of the academic course, as in this case, 49.10% of respondents were from economics, business, or engineering courses.
Table 2 shows the characterization of this population's use of catering facilities on ULHT's university campus. The number of lunches and dinners held at the same university declined in 2019 compared with 2018, however, the number of snacks and light meals increased over the same period. The largest percentage (24.90% in 2018 vs. 34.80% in 2019) of students reported spending on average between 1-3€ per day in ULHT bars. Also, the

foram realizadas mediante o software SPSS versão 26.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

Um total de 584 estudantes da ULHT, sendo que 229 eram homens e 355 mulheres, participaram nas presentes análises. As características gerais da população, de acordo com os anos em que foram realizadas as pesquisas (2018 vs. 2019) estão resumidas na Tabela 1. Os indivíduos inquiridos no ano de 2018 apresentavam, na sua maioria (70.40%) entre 20 e 25 anos, eram mulheres (62.60%), portuguesas (57.20%) e sobretudo pertencentes aos cursos de ciências da saúde (41.40%). Resultados muito similares foram obtidos em 2019, com exceção para a procedência do curso académico, já que neste caso 49.10% dos inquiridos pertenciam a cursos de economia, gestão ou engenharias.
Na Tabela 2 pode ser observada a caracterização da utilização por parte desta população das instalações de restauração existentes no campus universitário da ULHT.

Table 1 - General characteristics of the study population categorized by year of research. Data expressed as percentages (number of respondents)
Tabela 1 -Características gerais da população caracterizadas por ano de pesquisa. Dados expressos em percentagens (número de respondentes)

	2018 (n=297)	**2019** (n=287)
Age / Idade, % (n)		
<20 years / <20 anos	14.50 (43)	19.50 (56)
20-25 (2018), 20-24 (2019) years / anos	70.40 (209)	54.70 (157)
26-30 (2018), 25-30 (2019) years / anos	11.40 (34)	18.80 (54)
>30 years / >30 anos	3.70 (11)	7.0 (20)
Gender / Sexo, % (n)		
Men / Homem	37.40 (111)	41.10 (118)
Women / Mulher	62.60 (186)	58.90 (169)
Nationality / Nacionalidade, % (n)		
Portuguese / Portuguesa	57.20 (170)	77.00 (221)
Foreign / Estrangeiro	31.00 (92)	13.60 (39)
Dual nationality / Dupla nacionalidade	11.80 (35)	9.40 (27)
Academic course / Curso académico, % (n)		
Health / Saúde	41.40 (123)	36.20 (104)
Arts / Artes	9.10 (27)	2.80 (8)
Economics / Economia	14.50 (43)	49.10 (141)
Letters / Humanidades	31.30 (93)	9.10 (26)

Table 2 - Characterization of the university facilities utilization. Data expressed as percentages (number of respondentes) Abbreviations: ULHT, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Tabela 2 - Caracterização da utilização das instalações da universidade. Dados expressos em percentagens (número de respondentes). Abreviaturas: ULHT, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

.

.	**2018** (n=297)	**2019** (n=287)
Days per week attending ULHT / Dias por semana que frequenta ULHT	4.05 (1.49)	4.28 (1.16)
Hours per day attending ULHT / Horas por dia que passa na ULHT	-	2.04 (0.75)
Lunches and Dinners eaten at ULHT / Almoços e jantares por semana realizados na ULHT	1.65 (1.59)	1.46 (1.74)
Light meals per week eaten at ULHT / Refeições ligeiras por semana realizadas na ULHT	1.97 (1.66)	2.34 (2.27)
0€	13.80 (41)	15.30 (44)
1-3€	24.90 (74)	34.80 (100)
3-5€	29.00 (86)	25.40 (73)
5-7€	24.20 (72)	19.20 (55)
>7€	8.10 (24)	5.20 (15)
When not having lunch or dinner at ULHT bars? / Quando não almoça ou janta nos bares da ULHT?, % (n)		
Não consumo/ No consumption	16.20 (48)	5.20 (15)
Trago ou consumo em casa/ I bring or eat at home	49.20 (146)	77.40 (222)
Fora da ULHT/ Outside ULHT	34.70 (103)	17.40 (50)
When not having light meals at ULHT bars? / Quando não lancha nos bares da ULHT?, % (n)		
Não consumo/ No consumption	20.20 (60)	8.70 (25)
Trago ou consumo em casa/ I bring or eat at home	51.90 (154)	75.30 (216)
Fora da ULHT/ Outside ULHT	27.90 (83)	16.00 (46)
How much time for lunch at ULHT? / Quanto tempo de almoço na ULHT?, % (n)		
No consumption / Não consumo	14.80 (44)	17.40 (50)
Up to 10 minutes / Até 10 minutos	11.40 (34)	16.00 (46)
10-20 minutes / 10-20 minutos	27.30 (81)	13.20 (38)
20-30 minutes / 20-30 minutos	24.20 (72)	19.50 (56)
>30 minutes / >30 minutos	18.50 (55)	33.80 (97)
How much time for dinner at ULHT? / Quanto tempo de jantar na ULHT?, % (n)		
No consumption / Não consumo	59.90 (178)	82.60 (237)
Up to 10 minutes / Até 10 minutos	4.70 (14)	6.30 (18)
10-20 minutes / 10-20 minutos	8.10 (24)	3.50 (10)
20-30 minutes / 20-30 minutos	7.70 (23)	3.50 (10)
>30 minutes / >30 minutos	4.40 (13)	4.20 (12)
How much time for light meals at ULHT? / Quanto tempo de refeições ligeiras na ULHT?, % (n)		
No consumption / Não consumo	11.40 (34)	24.40 (70)
Up to 10 minutes / Até 10 minutos	55.60 (165)	52.60 (151)
10-20 minutes / 10-20 minutos	21.20 (63)	13.90 (40)
20-30 minutes / 20-30 minutos	4.70 (14)	5.20 (15)
>30 minutes / >30 minutos	2.40 (7)	3.80 (11)
How much time for breakfast at ULHT? / Quanto tempo de pequeno-almoço na ULHT?, % (n)		
No consumption / Não consumo	-	49.50 (142)
Up to 10 minutes / Até 10 minutos	-	33.80 (97)
10-20 minutes / 10-20 minutos	-	10.80 (31)
20-30 minutes / 20-30 minutos	-	3.50 (10)
>30 minutes / >30 minutos	-	2.40 (7)

majority of the participants reported consuming at or bringing home their lunches, dinners and light snacks when they are at ULHT and do not use their bars. Consumption in other bars/restaurants outside of ULHT decreased almost by half, compared to lunch/dinner (34.70% in 2018 vs. 17.40% in 2019) as well as snacks and light meals (27.90% in 2018 vs. 16.00% in 2019).
Regarding preferences or opinions about the existing catering facilities on the Lisbon university campus (Table 3) during 2018, most students have no preference over which snack bar is the cheapest, however, it seems evident that "A Cantina" is their favorite, as 41.40% consider the best value for money, 35.00% think it has the best distance and 33.30% think it has the best environment, compared to the other options. During 2019,

O número de almoços e jantares realizados na mesma universidade decresceu em 2019, em comparação com 2018, contudo, o número de lanches e refeições ligeiras aumentou no mesmo período de tempo. A maior percentagem (24.90% em 2018 vs. 34.80% em 2019) dos alunos refere gastar em média, entre 1 a 3€ por dia, nos bares da ULHT. Também a maioria da amostra refere consumir em/ou trazer de casa, os seus almoços, jantares e refeições ligeiras quando está na ULHT e não utiliza os seus bares. De referir que o consumo em outros bares/restaurantes fora da ULHT diminuiu quase para metade, em relação a almoços/ jantares (34.70% em 2018 vs. 17.40% em 2019) assim como, lanches e refeições ligeiras (27.90% em 2018 vs. 16.00% em 2019).

Table 3 - University snack bar preferences. Data expressed as percentages (number of respondentes)
Tabela 3 - Preferências sobre os bares da universidade. Dados expressos em percentagens (número de respondentes).

	2018 (n=297)	**2019** (n=287)
Cheapest snack bar / Bar mais económico, % (n)		
No preference / Sem preferência	37.40 (111)	-
Xiribitata	32.30 (96)	-
A Cantina	25.60 (76)	-
Best quality-price snack bar / Bar melhor qualidade-preço, % (n)		
No preference / Sem preferência	29.00 (86)	-
Xiribitata	21.20 (63)	-
A Cantina	41.40 (123)	-
Best distance snack bar / Bar melhor distância, % (n)		
No preference / Sem preferência	30.00 (89)	-
Xiribitata	23.20 (69)	-
A Cantina	35.00 (104)	-
Best environment snack bar / Bar melhor ambiente, % (n)		
No preference / Sem preferência	28.60 (85)	-
Xiribitata	29.00 (86)	-
A Cantina	33.30 (99)	-
Opinion about "*Xiribitata*"? / Opinião sobre "*Xiribitata*"?, % (n)		
Do not like / Não gosto	-	12.50 (36)
Do not go / Não vou	-	5.60 (16)
Indifferent / Indiferente	-	35.90 (103)
Like / Gosto	-	46.00 (132)
Opinion about "*A Cantina*"? / Opinião sobre "*A Cantina*"?, % (n)		
Do not like / Não gosto	-	4.90 (14)
Do not go / Não vou	-	8.00 (23)
Indifferent/ Indiferente	-	27.20 (78)
Like / Gosto	-	59.90 (172)
Opinion about "*100 Corantes*"? / Opinião sobre "*100 Corantes*"?, % (n)		
Do not like / Não gosto	-	2.10 (6)
Do not go / Não vou	-	35.50 (102)
Indifferent / Indiferente	-	24.40 (70)
Like / Gosto	-	38.00 (109)

the trend seems to continue, as 59.90% say they like "A Cantina", while only 46.00% have the same opinion for "Xiribitatá". Finally, 38.00% think that "100 Corantes" presents a concept of healthier food, however, it is a bit more expensive and in a location slightly farther from the center of the campus.

Regarding the preference and choice for a healthier bar in ULHT facilities, it seems that this decision is mainly conditioned by the price of meals, as most students mentioned this as the main condition of their choice, both in 2018 as in 2019. In this sense, most respondents also point out that only "sometimes" would they be willing to pay more than usual, or to go further, to dine in a healthier snack bar. Finally, 79.40% and 72.80% of respondents were interested in having access to the

Em relação às preferências ou opiniões sobre as instalações de restauração existentes no campus de Lisboa (Tabela 3) durante o ano de 2018, os alunos, na sua maioria, não têm preferência sobre qual o bar mais económico, contudo, parece evidente que A Cantina é o bar preferido dos mesmos, já que 41.40% considera que apresenta a melhor qualidade-preço, 35.00% considera que se encontra a uma melhor distância e 33.30% refere o seu melhor ambiente, em comparação com as restantes opções. Durante o ano de 2019, a tendência parece manter-se, já que 59.90% refere gostar d'A Cantina, enquanto somente 46.00% têm a mesma opinião em relação ao Xiribitatá e 38.00% em relação ao 100 corantes, que apresenta um conceito de comida mais saudável, um pouco mais dispendioso e com uma lo-

Table 4 - University healthy snack bar preferences and choices. Data expressed as percentages (number of respondentes)

Tabela 4 - University healthy snack bar preferences and choices. Dados expressos em percentagens (número de respondentes).

	2018 (n=297)	2019 (n=287)
Would you be a customer of a healthy snack bar at ULHT? / Seria cliente de um bar saudável na ULHT, % (n)		
Never consume / Nunca consumiria	1.00 (3)	2.80 (8)
Always consume / Consumiria sempre	17.50 (52)	33.80 (97)
Depends on the price / Depende do preço	47.80 (142)	56.40 (162)
Depends on the product / Depende do produto	33.70 (100)	7.0 (20)
Would you be willing to pay more at a healthier snack bar than you usually do?, % (n) / Estaria disposto a pagar mais num bar saudável do que paga habitualmente?, % (n)		
Never / Nunca	12.50 (37)	31.40 (90)
Rarely / Raramente	21.50 (64)	0.00 (0)
Sometimes / Às vezes	50.80 (151)	41.80 (120)
Always / Sempre	13.80 (41)	26.80 (77)
Would you be a client of a healthy snack bar even traveling further?, % (n) / Seria cliente de um bar saudável mesmo percorrendo uma maior distância?, % (n)		
Never / Nunca	3.40 (10)	8.0 (23)
Rarely / Raramente	13.10 (39)	18.10 (52)
Sometimes / Às vezes	69.70 (207)	68.30 (196)
Always / Sempre	10.80 (32)	5.60 (16)
Would you like to have access to the description of the ingredients used on the available products?, % (n) / Gostaria de ter acesso à descrição dos ingredientes dos produtos disponibilizados?, % (n)		
Yes / Sim	-	79.40 (228)
No / Não/	-	4.90 (14)
Indifferent / Indiferente	-	15.70 (45)
Would you like to have access to the nutritional composition of the available products?, % (n) / Gostaria de ter acesso à informação nutricional dos produtos disponibilizados?, % (n)		
Yes / Sim	-	72.80 (209)
No / Não	-	3.10 (9)
Indifferent / Indiferente	-	24.00 (69)

list of products/ingredients used, as well as nutritional information, respectively. These results can be clearly seen in Table 4.

Discussion

The purpose of this study was trying to understand the trends of healthy food consumption in young Portuguese university students. The number of lunches and dinners held in ULHT snack bars/restaurants decreased in 2019 compared to 2018. However, the number of snacks and light meals increased in the same period. This denotes a tendency of respondents to adhere to fast meals, as can be observed in the scientific literature (10). Another topic to take into account is that most respondents spend on average between 1-3€/day at ULHT snack bars.

According to the literature review (2), which advocates the "Modification of food supply in certain public spaces (higher education institutions)", a healthier snack bar was created at ULHT in 2019. Related with the price to pay for having this healthy snack bar, most students indicated that only "sometimes" would be willing to pay more than usual, or to travel a greater distance inside the university, to make their meals in this restaurant. These results were also recognized by Jiumpanyarach (7), which points to economic factors as an aspect that influences young people's choices beyond the quality of the food product.

One of the action plans for 2019-2020 (2) is to contribute to the implementation of an expressive nutrition labeling system. This action is of interest to the students, as 79.40% say they have an interest in the description of products and ingredients and 72.80% would like to have access to nutritional information.

It should be noted that consumption outside of ULHT was almost halved compared to lunch/dinners, snacks and light meals from 2018 to 2019, the opening year of the "100 Corantes" snack bar. The explanation to this relation may be because this new healthy snack bar has met a need for some students, however, additional studies are needed to answer this and other remaining questions.

calização ligeiramente mais afastada do centro do Campus.

Em relação à preferência e escolha por um bar mais saudável nas instalações da ULHT, parece ser que essa decisão é condicionada, sobretudo, pelo preço das refeições, já que a maioria dos estudantes referiu esta como a principal condicionante da sua escolha, tanto em 2018, como em 2019. Neste sentido, também a maioria dos inquiridos refere que só "às vezes" estaria disposto a pagar mais do que o habitual, ou percorrer uma maior distância, para efetuar as suas refeições num bar saudável. Finalmente, 79.40% e 72.80% dos inquiridos demonstram ter interesse sobre a descrição dos produtos e ingredientes disponibilizados, assim como, ter acesso à informação nutricional dos mesmos, respetivamente. Estes resultados podem ser observados em maior profundidade na Tabela 4.

Discussão

O propósito deste estudo visa entender as tendências de consumo de comida saudável em jovens universitários Portugueses. O número de almoços e jantares realizados nos bares/restaurantes da ULHT, decresceu em 2019, em comparação com 2018. Contudo, o número de lanches e refeições ligeiras aumentou no mesmo período de tempo. Isto denota uma tendência dos inquiridos em aderir a refeições rápidas, como se anteriormente descrito na evidência científica (12).

De acordo com a revisão da literatura (4), em que se defende a "Modificação da oferta alimentar em determinados espaços públicos (instituições do ensino superior)", foi criado na ULHT, em 2019, um bar com alimentação mais saudável. No entanto, a escolha dos estudantes por este tipo de alimentação revelou estar condicionada ao preço das refeições, já que a maioria dos estudantes acrescenta que só "às vezes" estaria disposto a pagar mais do que o habitual, ou a percorrer uma distância maior no interior da universidade, para efetuar as suas refeições num bar saudável. Estes resultados são reconhecidos no estudo de Jiumpanyarach, (11), que aponta os fatores económicos como um aspeto que influencia as escolhas dos jovens, para além da qualidade do produto alimentício. Outro aspeto a considerar é que a maioria dos respondentes gasta, em média entre 1-3€ por dia, nos bares da ULHT.

Um dos planos de ações para 2019-20 (4) é contribuir para a implementação de um sistema de rotulagem nutricional expressivo. E esta ação vai ao encontro do interesse dos estudantes, na medida em que 79.40% revelam ter interesse na descrição dos produtos e ingredientes utilizados na preparação dos pratos e 72.80%

Conclusions

To the best of our knowledge, the present study is the first to describe that the number of lunches and dinners held in ULHT restaurants decreased in 2019 compared to 2018. However, the number of snacks and light meals increased in the same period. It should be noted that consumption outside of ULHT has almost halved compared to lunch/dinners, snacks and light meals from 2018 to 2019, the opening year of the healthier snack bar. Related with the price to pay for eating in this healthy restaurant, most students add that only "sometimes" would be willing to pay more than usual, or to travel a greater distance inside the university, to make their meals in this restaurant. Finally, 79.40% of the evaluated students described interest in having the description of products and ingredients and 72.80% of them would like to have access to their nutritional information.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Economics - Operational Marketing discipline, for collecting the data.

Conflict of interests

The authors report no conflicts of interest.

gostariam de ter acesso à informação nutricional dos mesmos.
Importa referir que o consumo fora da ULHT, diminuiu quase para metade, em relação a almoços/jantares, lanches e refeições ligeiras, de 2018 para 2019, ano de abertura do Bar “100 Corantes”. Esta relação observada poderá ser explicada pelo facto deste bar ter vindo colmatar algumas necessidades dos estudantes, contudo futuros estudos são necessários para esclarecer esta e outras questões pendentes.

Conclusões

Pelo melhor do nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a descrever que o número de almoços e jantares realizados nos restaurantes da ULHT diminuiu em 2019 em comparação a 2018. No entanto, o número de lanches e refeições leves aumentou no mesmo período. É importante referir também, que o consumo de almoços e jantares, lanches e refeições leves fora da ULHT caiu quase para metade em 2019 (o ano da abertura do restaurante saudável) em comparação com 2018. Relacionado com o preço a pagar no restaurante saudável, a maioria dos estudantes acrescenta que apenas "às vezes" estaria disposto a pagar mais do que o habitual, ou a percorrer uma distância maior dentro da universidade, para efetuar as suas refeições neste estabelecimento. Finalmente, 79,40% dos estudantes avaliados descreveram interesse em ter a descrição de produtos e ingredientes utilizados na confeção dos pratos e 72,80% deles gostariam de ter acesso às suas informações nutricionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos alunos da licenciatura em Economia - disciplina de Marketing Operacional, pela recolha dos dados.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

References / Referências

1. Scalvedi ML, Saba A. Exploring local and organic food consumption in a holistic sustainability view. Br Food J. 2018;120(4):749–62.
2. Direção Geral da Saúde. Programana Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Direção Geral da Saúde. Lisbon, Portugal; 2019.
3. Savelli E, Murmura F, Liberatore L, Casolani N, Bravi L. Food habits and attitudes towards food quality among young students. Int J Qual Serv Sci. 2017;9(3–4):456–68.
4. Din N, Zahari MSM, Shariff SM. Customer Perception on Nutritional Information in Restaurant Menu. Procedia - Soc Behav Sci. 2012;42:413–21.
5. Jin N (Paul), Line ND, Lee SM. The health conscious restaurant consumer: Understanding the experiential and behavioral effects of health concern. Int J Contemp Hosp Manag. 2017;29(8):2103–20.
6. Bello Acebrón L, Calvo Dopico D. The importance of intrinsic and extrinsic cues to expected and experienced quality: An empirical application for beef. Food Qual Prefer. 2000;11(3):229–38.
7. Jiumpanyarach W. The impact of social trends: teenagers' attitudes for organic food market in Thailand. Int J Soc Econ. 2018 Feb 23;00–00.
8. King KA, Mohl K, Bernard AL, Vidourek RA. Does Involvement in Healthy Eating Among University Students Differ Based on Exercise Status and Reasons for Exercise?. Vol. 5, Californian Journal of Health Promotion. 2007.
9. Ganasegeran K, Al-Dubai SAR, Qureshi AM, Al-abed AAA, Am R, Aljunid SM. Social and psychological factors affecting eating habits among university students in a Malaysian medical school: a cross-sectional study. Nutr J. 2012 Jul 18;11:48.
10. Mathur S and PK Patodiya. Global perspective of fast-food consumption. Indian J Manag Sci. 2016;6(2):2249.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Nut. Food Sciences | C. Nut. Alimentação Biomed Biopharm Res., 2020; 17(1): 12-19

doi: 10.19277/bbr.17.1.221

Energy and macronutrient intake and dietary pattern among Universidade Lusófona students – a pilot study

Consumo de energia e macronutrientes e padrão alimentar nos estudantes da Universidade Lusófona – um estudo piloto

Joana Marcos [1], Raquel Carriço [1], Nelson Tavares [1,2], Carla Sá [3,4*]

[1]Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias (ULHT), Lisboa, Portugal; [2] Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona (CBIOS), Lisboa, Portugal; [3]Centro de Investigação em Desporto, Saúde e Desenvolvimento Humano – ISMAI, Maia, Portugal; [4]Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

* Corresponding author: carla.correiadesa@gmail.com

Abstract

Food choices for adopting a healthy lifestyle are influenced by a set of factors. Early adulthood and university entry are crucial for the development of eating habits that will be decisive in quality of life. In Portugal, there are few studies that assess the nutritional status of university students. The main objective of this study, as a pilot study, was to characterize the dietary habits of university students at Universidade Lusófona in Lisbon, Portugal. This cross-sectional descriptive study included university students, aged between 18 and 28 years old. Anthropometric data were collected, and body mass index was calculated. The dietary habits were assessed through a semi-quantitative food frequency questionnaire, administered directly. The average daily intake values were: energy, 2282.9 ± 954.0 kcal, 243.2 g of carbohydrates, 114.2 g of proteins, and 100.9 g of lipids. These values include a protein intake of 25.40%, 52.11% carbohydrate and 22.47% lipids. It was concluded that there is an increase in protein and lipid intake in samples from the university students evaluated.

Keywords: University students, food frequency questionnaire, recommended intake

Resumo

As escolhas alimentares para a adoção de um estilo de vida saudável são influenciadas por um conjunto de fatores. O início da idade adulta e a entrada na Universidade é crucial para o desenvolvimento de hábitos alimentares que serão decisivos na qualidade de vida. Em Portugal, são poucos os estudos que avaliam o estado nutricional de estudantes universitários, como tal, o principal objetivo deste estudo, como um estudo piloto, é avaliar a ingestão alimentar de 52 estudantes universitários da Universidade Lusófona em Lisboa, Portugal. Este estudo descritivo transversal teve como amostra estudantes universitários com idades compreendidas entre os 18 e os 28 anos de idade. Foi administrado de forma direta o questionário semi-quantitativo de frequência alimentar. Os resultados após a análise do questionário reportam que uma ingestão média da amostra corresponde a 2282,9 ± 954,0 kcal, 243,2 g hidratos de carbono, 114,2 g de proteínas e 100,9 g de lípidos. Estes valores correspondem a uma percentagem de ingestão de 25,4% de proteínas, 52,1% de hidratos de carbono e 22,5% de lípidos. Conclui-se que existe um aumento da ingestão proteica e lipídica na amostra de estudantes universitários avaliada.

Palavras-chave: Estudantes universitários, questionário de frequência alimentar, ingestão recomendada

Received / *Recebido*: 15/10/2019
Accepted / *Aceite*: 05/01/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Over the last decades, there has been a significant increase in the study of the importance of adopting healthy lifestyle habits (1-3). However, the increase in eating errors and physical inactivity have been identified as the main factors implicated in the origin of chronic diseases (2,4). In Portugal there has been a progressive loss of most of the characteristics of the traditional dietary pattern and the adoption of a western dietary pattern (5).

Food choices are influenced by a number of factors, including age, gender, lifestyle, beliefs, preferences, and costs. Admission to a university represents, in a way, the transition from youth to early adulthood, characterized by a stressful, tiring, period of more responsibility in regard to housing, financial management, and in particular unhealthy food choices. Several studies reveal that the main determinants of young college students' food choices are the lack of available time, convenience, and cost (6). With the increase of meals taken away from home, the choice of fast food chains and pre-cooked foods is characteristic of this age group (7). Higher education students are a population at risk for nutrient deficiency, especially micronutrients, derived from inadequate eating habits such as low consumption of fruits and vegetables, skipping meals (most commonly breakfast), and high consumption of fast food (8).

Health and good nutritional status are essential to achieve good school performance. Nevertheless, practices of an unhealthy lifestyle inevitably lead to nutritional deficiencies, which are very negative for young people, given the fact that they are in a period of intense and fast growth and unquestionably require the ingestion of all nutrients (9).

Considering these assumptions, this work was mainly focused on the characterization of the eating habits of a sample of university students from Universidade Lusófona in Lisbon, Portugal; it was specifically aimed to assess the caloric and macro and micronutrients intake.

Introdução

Nas últimas décadas tem-se assistido a um considerável aumento do estudo da importância da adoção de hábitos de vida saudáveis (1-3). No entanto, más práticas alimentares e inatividade física são identificados como os principais fatores implicados na origem de doenças crónicas e ao impacto que estas acarretam para os indivíduos (2,4).

Têm se verificado em Portugal, a perda progressiva da maioria das características do padrão alimentar tradicional e a adoção de um padrão alimentar ocidental (5). As escolhas alimentares são influenciadas por um conjunto de fatores, nomeadamente idade, sexo, estilo de vida, crenças, preferências e custos. A entrada na Universidade representa de certo modo, a transição da juventude para o início da idade adulta, sendo caracterizada por um estilo de vida "stressante", cansativo e de maior responsabilidade em relação à casa, gestão financeira e, em particular, escolhas alimentares pouco saudáveis. Diversos estudos revelam que os principais determinantes das escolhas alimentares dos jovens universitários são a falta de tempo disponível, a conveniência e o custo (6). Com o aumento das refeições realizadas fora de casa, a opção por cadeias de fast food e alimentos pré-confecionados é algo característico desta faixa etária (7). Os estudantes do ensino superior são uma população em risco de deficiências alimentares, principalmente de micronutrientes, derivado de hábitos alimentares desadequados, nomeadamente um baixo consumo de frutos e vegetais, incluindo hortícolas e leguminosas. A frequente omissão de refeições, nomeadamente o pequeno-almoço, a falta de variedade de alimentos ingeridos e o crescente consumo de refeições do tipo fast food são igualmente fatores que promovem deficiências nutricionais (8). A saúde e um bom estado nutricional são essenciais para alcançar um bom desempenho escolar. Contudo, estes tipos de práticas conduzem inevitavelmente à ocorrência de carências nutricionais, algo bastante negativo para os jovens uma vez que se encontram em intenso e rápido crescimento necessitando, inquestionavelmente, da ingestão de todos os nutrientes (9).

Considerando estes pressupostos, este trabalho teve como principal foco a caracterização dos hábitos alimentares de uma amostra de estudantes universitários da Universidade Lusófona, em Lisboa; Portugal, especificamente avaliar a ingestão calórica e de macro e micronutrientes.

Material and Methods

This paper is a cross-sectional descriptive study. Data collection took place during May 2019.

Sample

This study was made from a sample by convenience and consisted of 52 students from multiple courses [Nutrition (n=34), Sports (n=5), Communication (n=7) and Law (n=6)] of Universidade Lusófona and aged between 18 and 28 years. The total number of students at the Universidade Lusófona was approximately 11,350 (10). Data was obtained after written informed consent, and the questionnaires were conducted anonymously to ensure the confidentiality of the information collected.

Instruments

Sociodemographic, anthropometric and food intake assessment data were collected. All data was obtained throughthe participants' answers to the questionnaire.

Questionnaires

For sociodemographic characterization, the following data were collected: age, educational attainment, and personal background. For anthropometric evaluation, data was collected regarding height (m) and weight (kg), and body mass index (BMI) was calculated using the internationally recommended procedures by WHO (11). To assess food intake, a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) was applied and administered directly (12,13). In order to avoid biasing the answers, the participants had no prior knowledge of the content of the questionnaires. To obtain food consumption, the frequency reported for each item was multiplied by its standard average portion, in grams, and a seasonal variation factor for food consumed at specific times (0.25 was considered the three-month average seasonality).

Statistical analysis

Data are presented as mean (standard deviation) for cardinal variables, and absolute and relative frequencies (%) for nominal and ordinal variables. Foods were converted to nutrients using the Food Processor Plus software program (ESHA Research, Salem, OR, USA), with nutrition information from the US Department of Agriculture's food composition tables adapted to typically Portuguese foods. Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the distribution of variables. Data was analyzed by SPSS statistical package version 23.0 (IBM Inc., Armonk, New York, USA) and results were considered to be a statistically significant when $p < 0.05$.

Material e Métodos

O presente trabalho constitui um estudo descritivo transversal. A recolha de dados decorreu durante o mês de Maio de 2019.

Amostra

O estudo foi realizado a partir de uma amostra por conveniência, constituída por 52 estudantes de diversos cursos (Nutrição (n=34), Desporto (n=5), Comunicação (n=7) e Direito (n=6)) da Universidade Lusófona de Lisboa com idades compreendidas entre os 18 e 28 anos, considerando o total de alunos da Universidade Lusófona de 11.350 (10) estudantes. Os dados foram obtidos após o consentimento informado escrito, tendo os questionários sido realizados em anonimato para assegurar a confidencialidade da informação recolhida.

Instrumentos

Foram recolhidos dados sociodemográficos, antropométricos e avaliação da ingestão alimentar. Todos os dados foram obtidos por resposta dos participantes ao questionário.

Questionários

Para a caracterização sociodemográfica foram recolhidos os seguintes dados: idade, estado civil, habilitações literárias e antecedentes pessoais. Para a avaliação antropométrica foram recolhidos dados referentes à altura (1), peso (kg), e foi feito o cálculo do índice de massa corporal (IMC), usando os procedimentos internacionalmente recomendados pela OMS (11). Para a avaliação da ingestão alimentar recorreu-se à aplicação de um questionário semi-quantitativa de frequência alimentar (QFA), tendo a sua administração sido realizada de forma direta (12,13). De forma a evitar enviesamento das respostas, os participantes não tiveram conhecimento prévio do conteúdo dos questionários. Para a obtenção do consumo alimentar, a frequência referida para cada item foi multiplicada pela respetiva porção média padrão, em grama, e por um fator de variação sazonal para alimentos consumidos em épocas específicas (0,25 foi considerada a sazonalidade média de três meses).

Análise Estatística

Os dados estão apresentados por média (desvio padrão) para variáveis cardinais, e frequências absolutas e relativas (%) para as variáveis nominais e ordinais. A conversão dos alimentos em nutrientes foi efetuada utilizando como base o programa informático Food Processor Plus (ESHA Research, Salem, OR, USA), com

Results

Sample Characterization

The sample consisted of 52 university students from the Universidade Lusófona , 59.6% women and 40.4% men. The majority of students (65.4%) were in Nutrition course, and the mean age of the sample was 21.2 ± 1.8 years (range: 18 to 28). The average body mass index was 20.5 ± 5.6 kg/m^2. All participants did not have any associated pathology known to date.

Dietary Intake Assessment

The food intake of the participating students after conversion to nutrients is shown in Table 1, i.e., the values of the average daily macronutrient intake and energy obtained, after analyzing the food frequency questionnaire data.
Table 1 shows that the average intake of the sample corresponds to 2282.9 ± 954.0 kcal. These results are not in accordance with those presented in Dietary Reference Values of European Food Safety Authority (14,15). The possibility of inaccuracy of the referenced foods, as well as the concealment of the consumption of some foods, may explain the lower energy consumption (below the recommendations).

informação nutricional proveniente de tabelas de composição de alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, adaptada a alimentos tipicamente Portugueses. O teste de Shapiro-wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis. Os dados foram analisados pelo SPSS statistical package version 23.0 (IBM Inc., Armonk, New York), sendo considerado um resultado com significado estatístico, quando $p<0,05$.

Resultados

Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída por 52 estudantes universitários da Universidade Lusófona, em Lisboa, sendo que 59,6% sexo feminino e 40,4% sexo masculino. A maioria dos estudantes (65,4%) são do curso de Nutrição, e a média de idades da amostra foi de 21,2 ± 1,8 anos (variação entre 18 e os 28 anos). A média de índice de massa corporal foi de 20,5 ± 5,6 kg/m^2. Todos os participantes não têm qualquer patologia associada, conhecida até à data.

Ingestão Alimentar

A ingestão de alimentos após a conversão em nutrientes está representada na Tabela 1, ou seja, os valores da ingestão média diária de macronutrientes e energia obtidos após a análise dos dados do questionário de frequência alimentar.
A tabela 1 mostra que a ingestão média da amostra corresponde a 2282,9 ± 954,0 kcal, estes resultados não

Table 1 - Caloric intake (kcal), protein (grams), carbohydrates and lipids in university students (n = 52) of the Lusófona University of Lisbon

Tabela 1 -Ingestão calórica (kcal), proteínas (gramas), hidratos de carbono e lípidos em estudantes universitários (n=52) da Universidade Lusófona de Lisboa

	n	Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	Average/ Média	Standard Deviation/ Desvio Padrão	Percentage/ Percentagem
Calories (kcal)/ Calorias (Kcal)	52	1142.1	5271.9	2282.9	954.0	-
Proteins/ Proteínas	52	28.5	260.3	114,2	52.7	25.4%
Carbohydrates/ Hidratos de Carbono	52	68.8	519.7	234.2	101.4	52.1%
Lipids/ Lípidos	52	37.9	240.2	100.9	46.8	22.5%

Table 2 Comparison of the average daily intake of nutrientes by sex in university students (n = 52) of the Universidade Lusófona of Lisbon

Tabela 2 -Comparação do consumo médio diário de nutrientes por sexo em estudantes universitários (n = 52) da Universidade Lusófona de Lisboa

	Male/Masculino (n=21)	Female/Feminino (n=31)	*p* value[1]
Calories (kcal)/ Calorias (Kcal)	2605.4 ± 266.2	2064.5 ± 118.2	0.074
Proteins/ Proteínas (g)	127.1 ± 13.9	105.4 ± 7.6	0.183
Carbohydrates/ Hidratos de Carbono (g)	279.8 ± 25.8	203.3 ± 75.5	**0.013**
Lipids/ Lípidos (g)	110.6 ± 12.6	94.4 ± 37.3	0.265

[1]p-value for the comparison between male and female considered a result with statistical significance when p <0.05.

Regarding the macronutrients consumed, an average intake of 243.2 g carbohydrates, 114.2 g of protein, and 100.9 g of lipids was determined. These values correspond to a protein intake of 25.4%, 52.1% carbohydrate, and 22.5% lipids. When comparing differences between sex, we did not obtain statistically significant differences (Table 2), except in carbohydrates ($p < 0.05$). Male participants had a higher carbohydrates intake then female participants, and according to the Directorate General of Health (DGS) recommendations, the percentage of carbohydrates recommended (55 to 75%) is slightly higher than that obtained. However, because this disparity is not high, it is not considered of great relevance (16).

The current nutritional recommendations for total energy value, as a percentage, indicate a protein intake of between 10 and 15%, carbohydrates between 55 to 75%, and lipids between 15 to 30 %. The intake values of the study sample are within the recommendations, however, the protein intake of the study sample is 10% higher than recommended (Figure 1). The increase in protein intake by the sample under study may be due to the fact that college students and the Portuguese population (in general) consume more eggs, meat, and fish group than other food groups . It is important to highlight that this protein intake, mainly due to meat, suggests that there may be excess saturated fat, registered in this study at 28.5 ± 14.8g.

Moreover, the lipids are within the recommended values, although slightly higher than the recommended average intake. The range is due to the high consumption of products from the "sweets and pastries" group or the use of "oils and fats" for seasoning (14). It should be noted that although lipids are essential in a balanced diet, in this case this discrepancy arises from meals

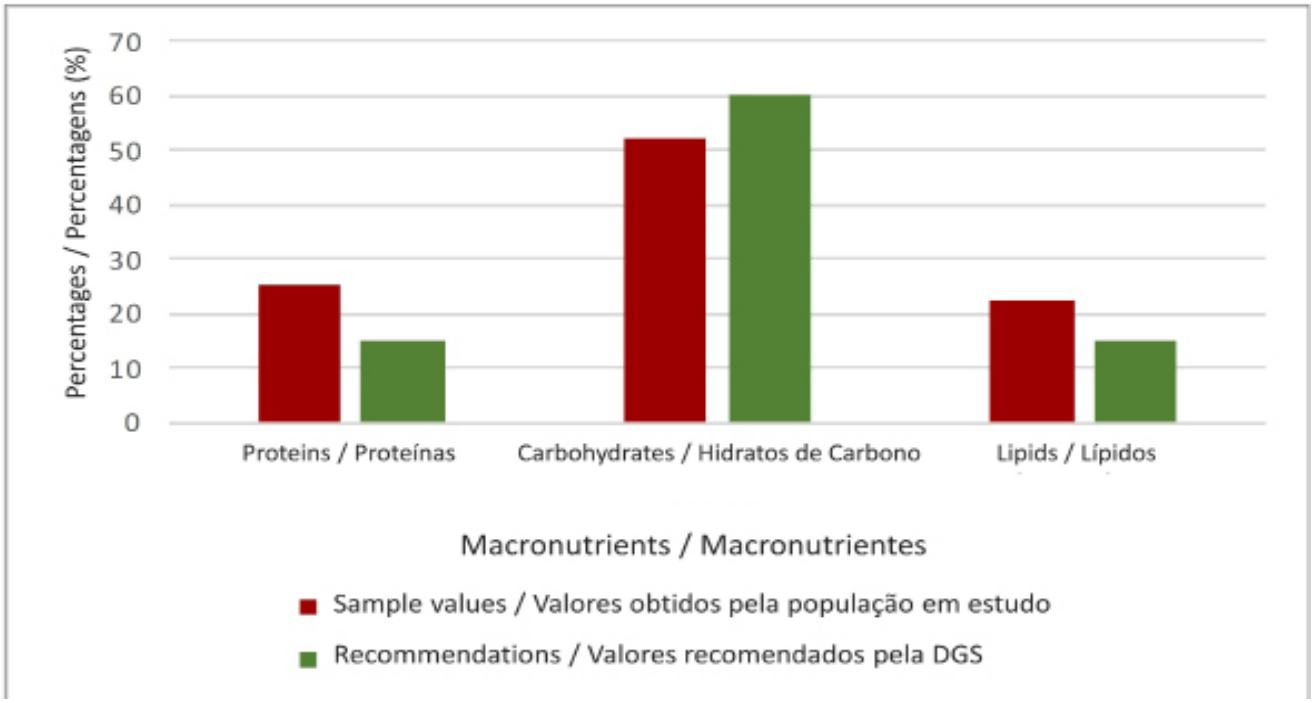
estão de acordo com os valores de referência da EFSA (14,15). A possibilidade de imprecisão dos alimentos referenciados, bem como a ocultação do consumo de alguns alimentos, poderá explicar os consumos energéticos inferiores às recomendações. Relativamente aos macronutrientes consumidos verifica-se que uma ingestão média de 243,2 g hidratos de carbono, 114,2 g de proteínas e 100,9 g de lípidos. Estes valores correspondem a uma percentagem de ingestão de 25,4% de proteínas, 52,1% de hidratos de carbono e 22,5% de lípidos. Ao comparar as diferenças entre sexos, não obtivemos diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2), exceto nos hidratos de carbono ($p<0,05$) que os homens ingerem em média uma quantidade superior em relação às mulheres, e de acordo com as recomendações da DGS, a percentagem de hidratos de carbono recomendada (55 a 75%), encontra-se ligeiramente superior à obtida, contudo devido a esta disparidade não ser elevada não se considera de grande relevância.

As recomendações nutricionais atuais para o valor energético total, em percentagem, declaram um consumo de proteínas entre 10 e 15%, hidratos de carbono de 55 a 75%, lípidos de 15 a 30% (16). O que comparado com os valores de ingestão da amostra em estudo, está dentro das recomendações, no entanto o valor da ingestão proteína da amostra é 10% superior ao recomendado (Figura 1). O aumento da ingestão de proteínas pela amostra em estudo, poder-se-á dever ao facto de os estudantes universitários consumirem mais alimentos do grupo dos "ovos, carnes e peixes" do QFA, do que outros grupos de alimentos. É importante destacar que este consumo proteico por advir principalmente das carnes, sugere que possa haver um excesso de gordura saturada, neste estudo foi de 28,5 ± 14,8g.

No caso dos lípidos está dentro dos valores recomen-

Figure 1 - Comparison between the daily intake of macronutrients (protein, percentage carbohydrates) between the sample of university students (n = 52) and the values recommended by the Directorate General of Health (DGS)

Figura 1 - Comparação entre a ingestão diária de macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono em percentagem) entre a amostra de estudantes universitários (n=52) e os valores recomendados pela direção geral de saúde (DGS)



based on processed food and high energy density foods, high in fat and sugars often eaten between meals.

There is an unbalanced dietary pattern associated with a sedentary lifestyle related to a change in macronutrient density in the diet, i.e., a higher amount of protein and lipids than carbohydrates. The diet of a typical young college student is predominant in foods rich in total fat, saturated fat, and cholesterol, and poor in fruits and vegetables (17). The concept of a traditional meal has been changing in both composition and cooking. This change is due to inconsistent school schedules, increased study demands, a lack of time management for household chores, separation from family, and a preference to consume meals away from home. Thus, according to Bernardo et al. (18), the lack of variety in college students' intake could be due, to an increase in the number of meals eaten in restaurants or pre-prepared because of the vast availability of fast and easily accessible food (fast food and snacks), as well as convenience, cost and the frequent omission of meals, namely breakfast and midday snacks.

This work has some limitations, the small number of participants limits the scope of this work, however, as a pilot study it is suitable for future development in this theme.

dados, apesar de ser um pouco superior à média de ingestão recomendada. O intervalo deve-se ao grande consumo de produtos do grupo "Doces e pastéis" ou à utilização de "Óleos e gorduras" para temperar (14). É de referir que apesar de os lípidos serem essenciais numa alimentação equilibrada, neste caso esta discrepância surge devido a refeições baseadas em comida processada, em alimentos com elevada densidade energética, ricos em gorduras e açúcares muitas vezes consumidos fora das refeições.

Nota-se um padrão alimentar desequilibrado associado a um estilo de vida sedentário relacionado com uma mudança da densidade de macronutrientes na dieta, ou seja, uma maior quantidade de proteínas e lípidos que hidratos de carbono. A alimentação de um típico jovem universitário predomina em alimentos ricos em gordura total, saturada e colesterol sendo pobre em frutas e hortícolas (17). O conceito de refeição tradicional tem vindo a alterar-se, tanto na composição como na confeção. Esta mudança deve-se a horários escolares desencontrados, maiores exigências no estudo, a uma falta de gestão de tempo de tarefas domésticas, afastamento da família e, não menos importante, o consumo preferencial de refeições realizadas fora de casa. Assim, a falta de variedade na ingestão dos estudantes univer-

Conclusion

Thus, our study concludes that there is an increase in protein intake in the sample of college students evaluated. This increase may trigger repercussions on future health, not only because of the protein intake, but also the the saturated fat intake, which may be accentuated by a decrease in healthy eating habits as they are in college education. Considering the limitations of this work, this preliminary data gives us an idea that the introduction of food education lectures will be necessary to inform the population how to have a healthy diet and to give some advice about cooking.

Conflict of interest

No conflicts of interest

sitários poderá ser explicada, de acordo com Bernardo et al. (18), por um aumento na quantidade de refeições consumidas em restaurantes ou pré-preparadas devido à disponibilidade de comida de fácil e rápido acesso (fast food e snacks), bem como a conveniência, o custo e a frequente omissão de refeições, nomeadamente o pequeno almoço e o lanche.
Este trabalho tem algumas limitações, o pequeno número de participantes limita o escopo deste trabalho, no entanto, como um estudo piloto, ele é adequado para o desenvolvimento futuro deste tema.

Conclusão

Deste modo, conclui-se que existe um aumento da ingestão proteica na amostra de estudantes universitários avaliada, este aumento poderá desencadear repercussões no estado de saúde futuro, não apenas pela quantidade de ingestão de proteínas, mas pela quantidade de ingestão de gordura saturada, que poderá ser acentuado por um decréscimo nos hábitos alimentares à medida que se encontram no ensino universitário. Considerando as limitações deste trabalho, estes dados preliminares indicam que é necessário a introdução de palestras de educação alimentar, com o intuito de informar a população sobre a adoção de um estilo de vida saudável e alguns conselhos sobre confeções saudáveis.

Conflitos de interesse

Não existem conflitos de interesse

References / Referências

1. Eze NM, Maduabum FO, Onyeke NG, Anyaegunam NJ, Ayogu CA, Ezeanwu BA, et al. Awareness of food nutritive value and eating practices among Nigerian bank workers Implications for nutritional counseling and education. Medicine. 2017;96(10).
2. Yahia N, Wang D, Rapley M, Dey R. Assessment of weight status, dietary habits and beliefs, physical activity, and nutritional knowledge among university students. Perspect Public Health. 2016;136(4):231-44.
3. Almutairi KM, Alonazi WB, Vinluan JM, Almigbal TH, Batais MA, Alodhayani AA, et al. Health promoting lifestyle of university students in Saudi Arabia: a cross-sectional assessment. BMC Public Health. 2018;18(1):1093.
4. Ssewanyana D, Abubakar A, van Baar A, Mwangala PN, Newton CR. Perspectives on Underlying Factors for Unhealthy Diet and Sedentary Lifestyle of Adolescents at a Kenyan Coastal Setting. Front Public Health. 2018;6.
5. Cruz JA. Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe--Southern Europe. Eur J Clin Nutr. 2000;54 Suppl 1:S29-35.
6. Davy SR, Benes BA, Driskell JA. Sex differences in dieting trends, eating habits, and nutrition beliefs of a group of Midwestern college students. J Am Diet Assoc. 2006;106(10):1673-
7. Tam R, Yassa B, Parker H, O'Connor H, Allman-Farinelli M. University students' on-campus food purchasing behaviors, preferences, and opinions on food availability. Nutrition. 2017;37:7-13.
8. Unusan N. University students' food preference and practice now and during childhood. Food Qual Prefer. 2006;17(5):362-8.
9. Kim SY, Sim S, Park B, Kong IG, Kim JH, Choi HG. Dietary Habits Are Associated With School Performance in Adolescents. Medicine (Baltimore). 2016;95(12):e3096.
10. Lusófona U. RELATÓRIO ANUAL 2017-18 https://www.ulusofona.pt/pt/media-ref/relatorio-anual-2017-18/download/relatorio-anual-2017-18.pdf2019
11. Nuttall FQ. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. Nutr Today. 2015;50(3):117-28.
12. Lopes C, Aro A, Azevedo A, Ramos E, Barros H. Intake and adipose tissue composition of fatty acids and risk of myocardial infarction in a male Portuguese community sample. J Am Diet Assoc. 2007;107(2):276-86.
13. Lopes C. Reprodutibilidade e Validação de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar. In: Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controlo de base populacional: Universidade do Porto; 2000.
14. Lopes C, Torres D, Oliveira A, Severo M, Guiomar S, Alarcao V, et al. National Food, Nutrition, and Physical Activity Survey of the Portuguese General Population (2015-2016): Protocol for Design and Development. JMIR Res Protoc. 2018;7(2):e42.
15. (EFSA) EFSA. Dietary Reference Values for nutrients www.efsa.europa.eu/publications2019 [
16. Candeias V, Nunes, E., Morais, C., Cabral, M., & Ribeiro da Silva, P. . Princípios para uma Alimentação Saudável.: Direção Geral de Saúde; 2005 [
17. Nicklas TA, Baranowski, T., Baranowski, J. C., Cullen, K., Rittenberry, L., & Olvera, N. . Family and child-care provider influences on preschool children's fruit, juice and vegetable consuption. Nutrition Review. 2001;59:224-30.
18. Bernardo GL, Jomori MM, Fernandes AC, Colussi CF, Condrasky MD, Proenca R. Nutrition and Culinary in the Kitchen Program: a randomized controlled intervention to promote cooking skills and healthy eating in university students - study protocol. Nutr J. 2017;16(1):83.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Nut. Food Sciences | C. Nut. Alimentação Biomed Biopharm Res., 2020; 17(1): 20-32

doi: 10.19277/bbr.17.1.226

A study of vegetable (thistle) rennet in the production of Flor de Guía cheese

Um estudo sobre o coalho vegetal (cardo) na produção de queijo Flor de Guía

Conrado Carrascosa [1], Liuva Vega [1], Rafael Millán [1], Pedro Saavedra [2], António Raposo [3*], Ariana Saraiva [4], Esther Sanjuán [1]

[1]Department of Animal Pathology and Production, Bromatology and Food Technology, Faculty of Veterinary, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain; [2]Department of Mathematics, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Mathematics Building, Campus Universitario de Tafira, 35018 Las Palmas de Gran Canaria, Spain ; [3]CBIOS (Research Center for Biosciences and Health Technologies), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; [4]Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

* Corresponding author: antonio.raposo@ulusofona.pt

Abstract

The Protected Designation of Origin for Flor de Guía Cheese includes two fundamental requirements: the exclusive use of vegetable (thistle) rennet from *Cynara cardunculus* var. *ferocisisima* or *Cynara escolymus*, as a milk coagulant, and to use certain percentages of milk with respect to the species of origin. These two variables, depending on the random criterion of the cheese-maker, give us the interest of knowing the possible influence they may have on the production process and therefore also on the variability of the final characteristics of the cheese. Thus, the proposed objectives were to study the influence of the use, on the one hand, of different concentrations of thistle (*C. cardunculus*) on the coagulation of different milk types and, on the other, of different mixtures of milk types (of different species) on the coagulation time. The tests for the coagulant activity were carried out following the Berridge technique modified by the NOVO method, obtaining the enzymatic solution from dried thistle flowers in maceration provided by a cheesemaker. The assays showed increased coagulant activity as the concentration of thistle extract increased (especially at low concentrations and on sheep and cow milk) as well as the percentage of sheep milk in the mixtures used as substrate. Further investigations about the use of these two variables, combining high percentages of sheep's milk and thistle extracts of moderate strength, will need for improving the sensory characteristics of Flor de Guía cheese

Keywords: Artisanal cheese, *Cynara cardunculus*, Flor de Guía cheese, vegetable rennet

Resumo

A Denominação de Origem Protegida para o queijo Flor de Guía inclui dois requisitos fundamentais: o uso exclusivo de coalho vegetal (cardo) de *Cynara cardunculus* var. *ferocissima* ou *Cynara escolymus*, como coagulante do leite, e o uso de certas percentagens de leite em relação às espécies de origem. Estas duas variáveis, dependendo do critério aleatório do produtor de queijos, revelam-nos o interesse de conhecer a possível influência que elas podem ter no processo de produção e, portanto, também a variabilidade das características finais do queijo. Assim, os objectivos propostos foram estudar a influência do uso, por um lado, de diferentes concentrações de cardo (*C. cardunculus*) na coagulação de diferentes tipos de leite e, por outro lado, em diferentes misturas de tipos de leite (de diferentes espécies) no tempo de coagulação. Os testes para a actividade coagulante foram realizados seguindo a técnica de Berridge modificada pelo método NOVO, obtendo a solução enzimática de flores de cardo secas em maceração, fornecidas por um queijeiro. Os ensaios mostraram actividade coagulante aumentada à medida que a concentração de extracto de cardo aumentou (especialmente em baixas concentrações e nos leites de ovelha e vaca), bem como a percentagem de leite de ovelha nas misturas usadas como substrato. Investigações adicionais sobre o uso dessas duas variáveis, combinando altas percentagens de leite de ovelha e extractos de cardo de força moderada, serão necessárias para melhorar as características sensoriais do queijo Flor de Guía.

Palavras-chave: Queijo artesanal, *Cynara cardunculus*, queijo Flor de Guía, coalho vegetal

Received / *Recebido*: 14/11/2019
Accepted / *Aceite*: 08/04/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

The first reference of milk coagulation with thistle, safflower seeds, or fig sap was made 50 years BC. The Greek writer Theophrastus made the first description of the thistle, although its identity was not yet correct. Thistle is cultivated in Europe, where it was introduced approximately in 1685, and is considered as a culinary speciality as well as a vegetable coagulant. Other plant species (e.g., pineapple, papaya) that also contain enzymes, specifically aspartic proteases, are also capable of coagulating milk. The sap of the wild fig tree has also been described in the *Iliad* of Homer as a milk coagulant.

Both in Spain and Portugal, extracts of different types of thistle are used for the production of some varieties of sheep cheeses. For the traditional production of these cheeses, the so-called "rennet grass" or "*yerbacuajo*" from the thistle flowers belonging to different species of the genus *Cynara* have been used (1).

Cynara cardunculus, commonly known as thistle, is a specie native to the Mediterranean, which belongs to the family *Compositae* (Asteraceae), grows wild in the south and west of the Mediterranean, Portugal, Madeira and the Canary Islands (2). It is the most popular species and the most used to make different Protected Designation of Origin (PDO) cheeses both in Spain and Portugal, although *C. humilis* and *C. scolymus* are species that are suitable for making these cheeses. They can be used as substitutes or mixed with *C. cardunculus* (3).

The main enzymes of *C. cardunculus*, responsible for coagulation are cardosins A and B, located in the feminine part of the plant. Cardosin A is considered to have activity and specificity similar to chymosin (an enzyme located in the stomach of ruminants), while cardosin B is similar to pepsin (also an enzyme located in the stomach of ruminants) (4). Cardosin B has a greater coagulant activity than A and C (5). Nowadays cardosins A and B are also known as cyprosins. The milk coagulation activity of this enzyme is due to the presence of three aspartic proteases, initially named cynarases 1, 2 and 3 (cyprosin B corresponding to cynarase 3), cardosin A is also known as cyprosin 1 and 2, while B as cyprosin 3 (6).

Introdução

A primeira referência de coagulação do leite com cardo, sementes de açafrão ou seiva de figo foi feita 50 anos A. C. O escritor grego Theophrastus fez a primeira descrição do cardo, embora a sua identidade ainda não estivesse correta. O cardo é cultivado na Europa, onde foi introduzido aproximadamente em 1685, e é considerado uma especialidade culinária e também um coagulante vegetal. Outras espécies vegetais (por exemplo, ananás, papaia) que também contêm enzimas, especificamente proteases aspárticas, também são capazes de coagular o leite. Além disso, a seiva da figueira selvagem foi descrita na *Ilíada* de Homero como coagulante do leite.

Tanto em Espanha como em Portugal, extractos de diferentes tipos de cardo são utilizados para a produção de algumas variedades de queijos de ovelha. Para a produção tradicional desses queijos, foi utilizado o chamado "rennet-grass" ou "*yerbacuajo*" das flores de cardo pertencentes a diferentes espécies do género *Cynara* (1).

Cynara cardunculus, vulgarmente conhecido como cardo, é uma espécie nativa do Mediterrâneo, pertencente à família *Compositae* (Asteraceae), que cresce selvagem no sul e oeste do Mediterrâneo, Portugal, Madeira e Ilhas Canárias (2). É a espécie mais popular e a mais usada para fabricar diferentes queijos de Denominação de Origem Protegida (DOP) tanto em Espanha como em Portugal, embora *C. humilis* e *C. scolymus* sejam espécies adequadas para a produção destes queijos. Estas espécies podem ser usados como substitutos ou misturados com *C. cardunculus* (3).

As principais enzimas de *C. cardunculus*, responsáveis pela coagulação, são as cardosinas A e B, localizadas na parte feminina da planta. Considera-se que a cardosina A possui actividade e especificidade semelhantes à quimosina (uma enzima localizada no estômago dos ruminantes), enquanto a cardosina B é semelhante à pepsina (também uma enzima localizada no estômago dos ruminantes) (4). A cardosina B tem uma actividade coagulante maior que A e C (5). Actualmente, as cardosinas A e B também são conhecidas como ciprosinas. A actividade de coagulação do leite desta enzima é devida à presença de três proteases aspárticas, inicialmente denominadas cinarases 1, 2 e 3 (ciprosina B correspondente à cinarase 3), cardosina A também conhecida como ciprosina 1 e 2, enquanto a B conhecida como ciprosina 3 (6).

Cheeses produced with vegetable plant rennet

In the Iberian Peninsula, especially in the area of Andalucía, Extremadura, Portugal and also the Canary Islands, different types of cheeses are produced with vegetable rennet and they are considered, in turn, PDO cheeses. *Cynara cardunculus* is the most common species of vegetable rennet that is used to make these cheeses by virtue of the high proteolytic activity of the enzymes located in its pistils.

Next, we describe the main PDO cheeses with their sensory and physical characteristics, from Portugal, Extremadura, Andalucía and the Canary Islands, made with vegetable rennet. Popular cheeses (7) made with vegetable rennet in Portugal include Serpa cheese, Azeitão Cheese, Évora cheese, Serra de Estrella cheese, Nisa cheese, and Castelo Branco cheese. Popular cheeses made with vegetable rennet in Spain include Torta del Casar cheese, La Serena cheese, Añejo de los Pedroches cheese, and Flor de Guía Cheese from the Canary Islands.

Flor de Guía Cheese

According to the Official State Gazette (BOE) with Resolution of April 15, 2008 for the elaboration of this type of cheese (8), Flor de Guía cheese will have to respect certain percentages of milk: “elaborated fundamentally with milk of Canarian sheep admitting, nevertheless, the mixture of milk of ewe with the one of other species, provided that the following proportions are respected: Canary sheep milk will always be present at least 60%”. “The maximum percentage to be used for Canarian cow's milk and its crosses will be 40%. The maximum proportion to be used of goat milk of any of the Canarian breeds is set at 10%”. It is also mentioned that: "Its main characteristic is that the coagulation of the milk will be made exclusively with vegetable rennet obtained from the dried flower heads of the varieties of the varieties of thistle *C. cardunculus* var. ferocissima and C. scolymus” (8).

For this reason, in this study we have set two clear objectives, 1) study the influence of the use of different concentrations of thistle (*C. cardunculus*) in the coagulation of different types of milk (coagulating activity), and 2) consider the effect on coagulation time through the use of thistle extract from the obtained mixtures of milk different species contemplated in the PDO used as raw material for the production of cheese and therefore, it could be the starting point of future studies about their influence on the final characteristics of the product.

Queijos produzidos com coalho de vegetais

Na Península Ibérica, especialmente na região da Andaluzia, Extremadura, Portugal e também nas Ilhas Canárias, diferentes tipos de queijos são produzidos com coalho de vegetais, que são considerados, por sua vez, queijos DOP. *Cynara cardunculus* é a espécie mais comum de coalho vegetal usada para fazer esses queijos em virtude da sua elevada actividade proteolítica das enzimas localizadas em seus pistilos.

Em seguida, descrevemos os principais queijos DOP com as suas características sensoriais e físicas, de Portugal, Extremadura, Andaluzia e Ilhas Canárias, elaborados com coalho de vegetais. Os queijos populares (6,7) elaborados com coalho de vegetais em Portugal incluem queijo de Serpa, queijo de Azeitão, queijo de Évora, queijo Serra da Estrella, queijo de Nisa, e queijo de Castelo Branco. Os queijos populares elaborados com coalho de vegetais em Espanha incluem queijo Torta del Casar, queijo La Serena, queijo Añejo de los Pedroches, e queijo Flor de Guía das Ilhas Canárias.

Queijo Flor de Guía

De acordo com o Diário Oficial do Estado (BOE) com a Resolução de 15 de abril de 2008 para a elaboração deste tipo de queijo (8), o queijo Flor de Guía deverá respeitar determinadas porcentagens de leite: "elaborado fundamentalmente com leite de ovelha das Canárias, admitindo, no entanto, a mistura de leite de ovelha com a de outras espécies, desde que sejam respeitadas as seguintes proporções: estar sempre presente pelo menos 60%". “O percentual máximo a ser usado para o leite de vaca das Canárias e seus cruzamentos será de 40%. A proporção máxima a ser utilizada para o leite de cabra de qualquer uma das raças das Canárias é fixada em 10%”. Também é mencionado que: "A sua principal característica é que a coagulação do leite será feita exclusivamente com coalho vegetal obtidos a partir das cabeças secas das flores das variedades de cardo *C. cardunculus* var. ferocissima e C. scolymus” (8).

Por esse motivo, neste estudo, estabelecemos dois objetivos claros: 1) estudar a influência do uso de diferentes concentrações de cardo (*C. cardunculus*) na coagulação de diferentes tipos de leite (actividade de coagulação) e 2) considerar a efeito no tempo de coagulação através do uso de extracto de cardo das misturas de leite obtidas de diferentes espécies contempladas na DOP utilizadas como matéria-prima para a produção de queijo e, portanto, poderia ser o ponto de partida de estudos futuros sobre a sua influência nas características finais do produto.

Materials and Methods

In this work, we used dried wild thistles of the species *C. cardunculus*, which were provided by a cheese factory located in Santa María de Guía (Gran Canaria) where they are used for the production of their cheeses. For the preparation of the thistle extract used in this study, we followed the same guidelines as those followed by the cheesemaker (in terms of the water used for maceration, filter purifier, maceration time and temperature). Thus, the coagulation of the milk for the preparation of the cheeses took place in 30-60 minutes at 37ºC and 62% relative humidity.

When the thistles flowers have been harvested and the petals were dried, then they were stored in hermetically sealed bags or crystal containers until being used at the maceration process. The appropriate amount of thistle flower was weighed; distilled water was added, in a controlled amount to allow maceration. This process has been standardized by the PDO Flor de Guía cheese, where the manipulation and concentration of thistle flower (*C. cardunculus*) are described.

In order to obtain an optimized enzymatic solution, solutions were prepared at five different concentrations. An initial concentration of 0.13 g of thistle extract in 12.5 ml of distilled water was made, simulating the same concentrations used by the cheesemaker with the same quantity of water. Likewise, duplicate (0.26 g), triplicate (0.39 g), quadruplicate (0.52 g), and quintuplicate (0.65 g) concentrations were each prepared in 12.5 mL of distilled water. Tests were carried out with these concentrations to determine which best adapts to the criterion of the Berridge technique modified by the NOVO method (9), which recommends that the best concentration of thistle extract is that which coagulates the milk in 4.5 – 5.5 minutes.

Reconstituted milk

In order to carry out the coagulation time tests for the different extracts prepared with different concentrations of thistle, the Severinsen technique (9) indicates that they must be carried out on reconstituted milk, with specific characteristics.

The reconstituted milk was made using skimmed milk powder (Nestlé Spain S.A., Barcelona, Spain). For its reconstitution, 12 g of powdered milk was mixed in 100 ml of 0.01 M $CaCl_2$ (1873,1000, Panreac Applicem, Barcelona, Spain).

Materiais e Métodos

Neste trabalho, utilizámos cardos selvagens secos da espécie *C. cardunculus*, fornecidos por uma fábrica de queijos localizada em Santa María de Guía (Gran Canaria), onde são utilizados para a produção dos seus queijos. Para a preparação do extracto de cardo, utilizado neste estudo, seguimos as mesmas orientações do fabricante de queijos (em termos de água utilizada para maceração, purificador de filtro, tempo e temperatura de maceração). Quando as flores de cardos são colhidas e as pétalas secas, elas foram armazenadas em sacos hermeticamente fechados ou em recipientes de cristal até serem utilizadas no processo de maceração.

As pétalas secas foram armazenadas em sacos hermeticamente fechados. A quantidade adequada de flor de cardo foi pesada; foi adicionada água destilada, em quantidade controlada para permitir a maceração. Este processo foi padronizado pelo queijo DOP Flor de Guía, onde são descritas a manipulação e a concentração da flor de cardo (*C. cardunculus*).

Para obter uma solução enzimática optimizada, foram preparadas soluções em cinco concentrações diferentes. Foi realizada uma concentração inicial de 0,13 g de extracto de cardo em 12,5 ml de água destilada, simulando as mesmas concentrações usadas pelo queijeiro com a mesma quantidade de água. Da mesma forma, as concentrações de duplicado (0,26 g), triplicado (0,39 g), quadruplicado (0,52 g) e quintuplicado (0,65 g) foram preparadas em 12,5 ml de água destilada. Foram realizados testes com estas concentrações para determinar a que melhor se adapta ao critério da técnica de Berridge modificado pelo método NOVO (9), que recomenda que a melhor concentração do extracto de cardo seja a que coagula o leite em 4,5 - 5,5 minutos.

Por fim, a coagulação do leite para a preparação dos queijos ocorreu em 30-60 minutos a 33-34ºC e 62% de humidade relativa.

Leite reconstituído

Para realizar os testes de tempo de coagulação para os diferentes extractos preparados com diferentes concentrações de cardo, a técnica Severinsen (9) indica que eles devem ser realizados em leite reconstituído, com características específicas.

O leite reconstituído foi elaborado com leite em pó desnatado (Nestlé Spain S.A., Barcelona, Spain). Para sua reconstituição, 12 g de leite em pó foram misturados em 100 ml de $CaCl_2$ 0,01 M (1873,1000, Panreac Applicem, Barcelona, Espanha).

Table 1 - Milk type combinations evaluated. Values shown are relative percentages %
Tabela 1 - Combinações de tipos de leite avaliadas. Os valores mostrados são percentagens relativas %

	Treatment / Tratamento								
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Sheep / Ovelha	60	60	70	70	80	80	90	90	100
Cow / Vaca	30	40	20	30	10	20	0	10	0
Goat / Cabra	10	0	10	0	10	0	10	0	0

Mixed milk from cow, sheep and goat

The milk used for the observation of the influence of the percentages of mixed milk from different species (cow, sheep and goat) in the coagulation tests with thistle extract was collected directly from the farm. The milk was obtained after milking the animals, and they were transported (1.5 L of each species), directly to the laboratory of Bromatology of the Faculty of Veterinary of the University of Las Palmas de Gran Canaria, where they were stored at 4ºC into the refrigerator.
The samples were distributed in quantities of 10 ml in glass test tubes, separated according to milk species and kept frozen until required for further analysis.
Table 1 shows the experimental conditions, which are defined by the percentage that must be higher or equal to 60% for sheep milk and for cow and goat milks, less than or equal to 40% and 10%, respectively.

Coagulation test of milk with thistle extract

The Berridge technique, modified by the NOVO method (9), was used to determine the coagulant force of the thistle rennet produced. Thus, 10 ml of each mixture of milk and reconstituted milk, previously adjusted to pH 6.4 by the addition of 0.1 N of NaOH (181693.1211, Panreac Applicem, Barcelona, Spain), were placed in test tubes and left to be tempered in a bain-marie at approximately 33-34 ºC. Next, 1 ml of the solution of the prepared thistle extract was added to each of the test tubes and placed again in a bain-marie in an inclined position.
The tubes were rotated slowly manually (ten times) to observe the moment of the formation of the lumps in the wall of the tube or the breakage of the milk film. The coagulation time from the beginning of inoculation with the extract to the beginning of coagulation was measured. The coagulation tests in the different milk mixtures were done in five replicates.
All coagulation time control tests were performed by the same observer under the same criteria.

Leite misto de vaca, ovelha e cabra

O leite utilizado para a observação da influência das percentagens de leite misto de diferentes espécies (vaca, ovelha e cabra) nos testes de coagulação com extracto de cardo foi recolhido directamente da quinta. A mistura foi obtida após a ordenha dos animais e estes foram transportados (1,5 l de cada espécie), directamente para o laboratório de Bromatologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Las Palmas de Gran Canaria, onde foram armazenados a 4ºC em refrigeração.
As amostras foram distribuídas em quantidades de 10 ml em tubos de ensaio de vidro, separados de acordo com as espécies de leite e mantidos congelados até serem necessários para análises posteriores.
A Tabela 1 mostra as condições experimentais, definidas pela percentagem, que deve ser maior ou igual a 60% para o leite de ovelha e para os leites de vaca e cabra, inferior ou igual a 40% e 10%, respectivamente.

Teste de coagulação do leite com extracto de cardo

A técnica de Berridge, modificada pelo método NOVO (9), foi utilizada para determinar a força coagulante do coalho produzido pelo cardo. Assim, 10 ml de cada mistura de leite e leite reconstituído, previamente ajustados a pH 6,4 pela adição de 0,1 N de NaOH (181693.1211, Panreac Applicem, Barcelona, Espanha), foram colocados em tubos de ensaio e colocados para serem temperados em banho-maria a aproximadamente 33-34 ºC. Em seguida, 1 ml da solução do extracto de cardo preparado foi adicionado a cada um dos tubos de ensaio e colocado novamente em banho-maria em posição inclinada.
Os tubos foram rotacionados lentamente manualmente (dez vezes) para observar o momento da formação dos grumos na parede do tubo ou a quebra do filme de leite. Foi medido o tempo de coagulação desde o início da inoculação com o extracto até o início da coagulação. Os testes de coagulação nas diferentes misturas de leite foram realizados em cinco repetições.

Statistical analysis

A graphic exploration of the data suggests that the coagulation time (until the beginning) decreased as the percentage of sheep´s milk increased, but tends to increase when at a percentage of 100% (i.e., using sheep´s milk only). Therefore, the variables included in the multivariate linear analysis were: % Sheep, % Cow and binary variable with value one when % Sheep = 100 and zero otherwise (%Sheep=100).
Then, a selection of variables based on the subset best regression and Bayesian Information Criterion (BIC) was conducted. The estimated model was summarized as coefficients, standard errors (SE,) and p-values. The goodness of fit was assessed by mean of the adjusted R-square, which takes values between 0 and 1. Statistical significance was set at $p< 0.05$. Data was analyzed using the R package, version 3.1.1 (10).

Results and Discussion

Determination of the strength of rennet

In order to assess the strength of this vegetable rennet (thistle), tests were conducted to coagulate reconstituted milk at pH 6.4 with different concentrations of thistle extract (Table 2), according to the NOVO technique (9). The different experiments obtained are presented below:

According to the Storch and Segelke equation, the reaction speed must be proportional to the concentration of the enzyme and, consequently, the product of the rennet concentration multiplied by the coagulation time of the milk must be constant. That is to say:

C x T = K

C= rennet concentration; T= milk coagulation time; K= constant.

This occurs in the tests carried out in this study, especially in concentrations of 1 to 3% of the thistle extract tested. It is necessary to take into account the variability of the enzymatic concentration in each prepared extract, however, it is not possible to control the parts of dried thistle.

Todos os testes de controlo do tempo de coagulação foram realizados pelo mesmo observador, sob os mesmos critérios.

Análise estatística

Uma exploração gráfica dos dados sugere que o tempo de coagulação (até o início) diminuiu à medida que a percentagem de leite de ovelha aumentou, mas tende a aumentar quando em uma porcentagem de 100% (ou seja, usando apenas leite de ovelha). Portanto, as variáveis incluídas na análise linear multivariada foram: % ovelha, % vaca e variável binária com valor 1 quando % ovinos = 100 e zero caso contrário (% ovinos = 100). Em seguida, foi realizada uma selecção de variáveis com base no melhor subconjunto de regressão e no Critério de Informação Bayesiano (BIC). O modelo estimado foi resumido em coeficientes, erros padrão (SE) e valores de p. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio do R quadrado ajustado, que assume valores entre 0 e 1. A significância estatística foi definida como $p <0,05$. Os dados foram analisados através do pacote R, versão 3.1.1 (10).

Resultados e Discussão

Determinação da força do coalho

Para avaliar a força deste coalho vegetal (cardo), foram realizados testes para coagular o leite reconstituído a pH 6,4 com diferentes concentrações de extracto de cardo (Tabela 2), de acordo com a técnica NOVO (9).
As diferentes experiências obtidas são apresentadas abaixo:

Segundo a equação de Storch e Segelke, a velocidade da reação deve ser proporcional à concentração da enzima e, consequentemente, o produto da concentração de coalho multiplicada pelo tempo de coagulação de leite deve ser constante. Ou seja:

C x T = K

C= concentração do coalho; T= tempo de coagulação do leite; K= constante.

Isto ocorre nos testes realizados neste estudo, principalmente nas concentrações de 1 a 3% do extracto de cardo testado. É necessário ter em consideração a variabilidade da concentração enzimática em cada extracto preparado, no entanto, não é possível controlar as partes do cardo seco.

Table 2 - Coagulation times (minutes), depending on the concentration of thistle used
Tabela 2 - Tempos de coagulação (minutos), dependendo da concentração de cardo utilizada

Concentration of extract / Concentração de extracto (g/100 ml H_2O)	Coagulation time / Tempo de coagulação		
	Test / Teste 1	Test / Teste 2	Average time / Tempo médio
1	19:46	18:04	18:75
2	8:34	9:14	8:74
3	6:08	5:40	5:74
4	4:16	4:09	4:125
5	3:23	3:28	3:255

As the concentration of thistle extract increased, the coagulation time was shorter. At a concentration of 1%, coagulation was made at 18:75 minutes, while for a concentration of 5%, only 3:255 minutes are needed.
In general, high concentrations of thistle flower extract do not significantly influence coagulation activity, however, at low concentrations, coagulation time tends to increase with decreasing enzyme concentration (Figure 1).
These observations were in agreement with those carried out by Garcia et al. (11,12) in a study that compared the use of two types of thistle extract (*Cynara cardunculus* L. and *Cynara scolymus* L.) on the coagulation time of milk. A similar result was observed by Sanjuán and Fernández-Salguero (1) in a study on the influence of some factors on the coagulation time by vegetable rennet (*Cynara* sp.).

À medida que a concentração do extracto de cardo aumentava, o tempo de coagulação era menor. Numa concentração de 1%, a coagulação foi realizada aos 18:75 minutos, enquanto que para uma concentração de 5%, foram necessários apenas 3:255 minutos.
Em geral, altas concentrações de extracto de flor de cardo não influenciam significativamente a actividade de coagulação, no entanto, em baixas concentrações, o tempo de coagulação tende a aumentar com a diminuição da concentração de enzimas (Figura 1).
Estas observações estavam de acordo com as realizadas por Garcia et al. (11,12) num estudo que comparou o uso de dois tipos de extracto de cardo (*Cynara cardunculus* L. e *Cynara scolymus* L.) no tempo de coagulação do leite. Resultado semelhante foi observado por Sanjuán e Fernández-Salguero (1) num estudo sobre a influência de alguns factores no tempo de coagulação pelo coalho de vegetais (*Cynara* sp.).

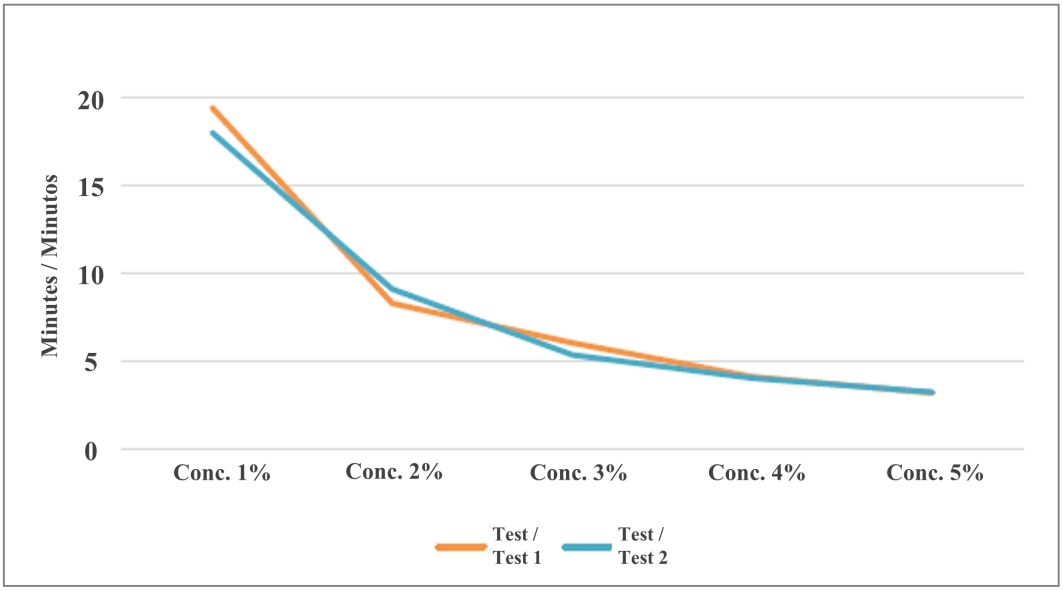


Figure 1 - Coagulation activity (minutes) of different concentrations of thistle in reconstituted milk
Figura 1 - Actividade de coagulação (minutos) de diferentes concentrações de cardo no leite reconstituído

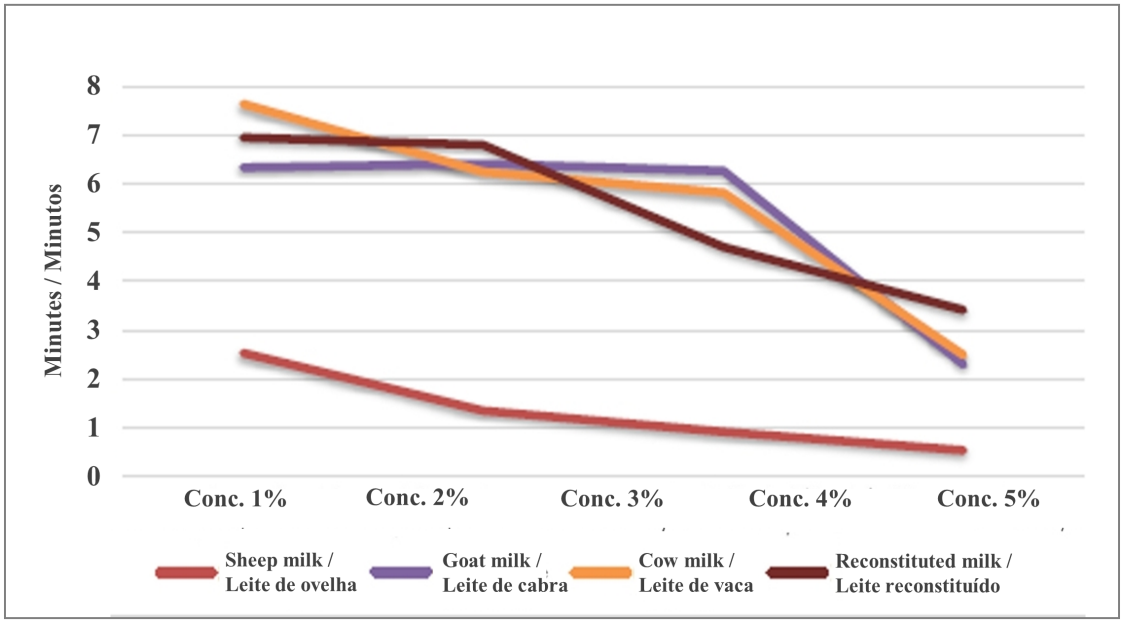


Figure 2 - Coagulation time (minutes) with different percentages (%) of thistle extract in different types of milk

Figura 2 -Tempo de coagulação (minutos) com diferentes percentagens (%) de extracto de cardo em diferentes tipos de leite

Effect of the concentration of thistle extract on the time of milk coagulation

The results of coagulation tests on different types of milk (sheep, cow, goat and reconstituted milk) carried out with different concentrations of thistle extracts are presented in Figure 2.

With regard to milk type, the sheep's milk took the least time to achieve coagulation with the different concentrations of thistle extract. As the concentration of the thistle extract used increased, coagulation time decreased.

A curious fact is that with goat's milk coagulation time remains at 6 minutes for concentrations of 2.3% and 4%. It is possible that the protein composition of the milk of this species is not as sensitive to the concentration of the coagulation enzyme. Some authors (13) found goat milk with high fat content could be associated with better coagulation properties in cheese making, whereas milk with high protein content could be associated with delayed coagulation, and milk with a large quantity of casein associated with improved renneting ability only once coagulation had begun (i.e., curd firmness).

As already observed in the previous test for the test of rennet strength with reconstituted milk, it was observed that coagulation was slowest in the different milk types at the 2% concentration of thistle extract. In contrast,

Efeito da concentração de extracto de cardo no tempo de coagulação do leite

Os resultados dos testes de coagulação em diferentes tipos de leite (ovelha, vaca, cabra e leite reconstituído) realizados com diferentes concentrações de extractos de cardo são apresentados na Figura 2.

No que diz respeito ao tipo de leite, o leite de ovelha foi o que levou menos tempo para obter coagulação com as diferentes concentrações de extracto de cardo. À medida que a concentração do extracto de cardo usado aumentava, o tempo de coagulação diminuía.

Um facto curioso é que, com a coagulação do leite de cabra, o tempo permanece em 6 minutos para concentrações de 2,3% e 4%. É possível que a composição proteica do leite desta espécie não seja tão sensível à concentração da enzima de coagulação. Alguns autores (13) descobriram que o leite de cabra com alto teor de gordura pode estar associado a melhores propriedades de coagulação na fabricação de queijos, enquanto o leite com alto teor de proteína pode estar associado a atraso na coagulação e o leite com uma grande quantidade de caseína associada apenas à melhoria da capacidade de coagulação. uma vez iniciada a coagulação (ou seja, firmeza da coalhada).

Como já observado no teste anterior para o teste à força do coalho com leite reconstituído, observou-se que a coagulação foi mais lenta nos diferentes tipos de leite na concentração de 2% de extracto de cardo. Por outro

Table 3 - Coagulation times according to percentages of milk mixture of different species using 1% thistle extract. X ± sd → average ± standard deviation

Tabela 3 - Tempos de coagulação de acordo com percentagens da mistura de leite de diferentes espécies usando extracto de cardo a 1%. X ± sd → média ± desvião padrão

% Sheep Milk / % Leite de Ovelha	% Cow Milk / % Leite de Vaca	% Goat Milk / % Leite de Cabra	Coagulation Time / Tempo de coagulação					X ± sd
60	**30**	**10**	*4.55*	*5.02*	*5.11*	*4.42*	*4.49*	**4.718 ± 0.322**
60	**40**	**0**	*5.26*	*5.28*	*4.55*	*4.26*	*4.12*	**4.694 ± 0.548**
70	**20**	**10**	*5.23*	*5.02*	*5.00*	*4.30*	*4.41*	**4.792 ± 0.411**
70	**30**	**0**	*4.08*	*4.25*	*4.25*	*3.35*	*3.57*	**3.900 ± 0.415**
80	**10**	**10**	*3.55*	*3.54*	*4.00*	*3.45*	*3.44*	**3.596 ± 0.231**
80	**20**	**0**	*4.11*	*4.03*	*4.01*	*4.03*	*3.50*	**3.936 ± 0.247**
90	**0**	**10**	*3.57*	*3.37*	*3.25*	*3.19*	*3.23*	**3.322 ± 0.154**
90	**10**	**0**	*3.15*	*3.30*	*3.26*	*2.44*	*3.59*	**3.148 ± 0.428**
100	**0**	**0**	*4.25*	*4.25*	*4.20*	*4.16*	*4.27*	**4.226 ± 0.045**

the 5% concentration of thistle extract was the fastest to achieve coagulation.

If we analyse the coagulation times individually according to the concentrations of thistle extract, we observe that in sheep's milk coagulation was achieved in less time. However, there are differences in the type of milk that were slower to coagulate as below:

- Concentration 2%: Cow's milk and reconstituted milk were the slowest to coagulate.
- Concentration 3%: Goat's and reconstituted milk were the slowest to coagulate.
- Concentration 4%: Goat and cow milk were the slowest to coagulate.
- Concentration 5%: Cow's milk and reconstituted milk were the slowest to coagulate.

To observe the influence of milk mixtures of different species on the remaining coagulation tests, a concentration of 1% was taken as a standard condition when preparing the thistle extract. This concentration resulted in a coagulation time approximately within the limits stipulated by the NOVO, Severinsen (9), or modified Berridge method, necessary for the Storch and Segelke equation to be valid (4.5 to 5.5 minutes).

Influence of mixtures of milk used as a substrate on coagulation time

Table 3 shows the descriptive results of the coagulation times obtained from the nine milk mixtures of different species using a thistle extract at 1%, including the (milk) percentages covered by the DOP of Flor de Guía cheese.

lado, a concentração de 5% de extracto de cardo foi a mais rápida a obter coagulação.

Se analisarmos os tempos de coagulação individualmente de acordo com as concentrações de extracto de cardo, observamos que a coagulação do leite de ovelha foi alcançada em menos tempo. No entanto, existem diferenças no tipo de leite que foram mais lentas para coagular como abaixo se demonstra:

- Concentração 2%: o leite de vaca e o leite reconstituído foram os mais lentos a coagular.
- Concentração de 3%: o leite de cabra e o leite reconstituído foram os mais lentos a coagular.
- Concentração 4%: o leite de cabra e vaca foi o mais lento a coagular.
- Concentração 5%: o leite de vaca e o leite reconstituído foram os mais lentos a coagular.

Para observar a influência de misturas de leite de diferentes espécies nos restantes testes de coagulação, uma concentração de 1% foi tomada como condição padrão na preparação do extracto de cardo. Essa concentração resultou em um tempo de coagulação aproximadamente dentro dos limites estipulados pelo NOVO, Severinsen (9) ou método de Berridge modificado, necessário para que a equação de Storch e Segelke fosse válida (4,5 a 5,5 minutos).

Influência das misturas de leite utilizadas como substrato no tempo de coagulação

A Tabela 3 mostra os resultados descritivos dos tempos de coagulação obtidos das nove misturas de leite de diferentes espécies usando um extracto de cardo a 1%,

Based on the graphic exploration of these data, a linear model was proposed for the variable "coagulation time", depending on the percentage of sheep's milk used, with a correction for the concentration of 100% sheep's milk.
The selected model (best subset regression and BIC) has the form:

$$Coagulation\ Time = \beta 0 + \beta 1 \cdot \%Sheep + \beta 2 \cdot (\%Sheep=100) + e$$

being $I(\%Sheep=100)$ 1 or 0 according to $\%Sheep = 100$ or not and e the error term.

The term β1 reflects the expected change in coagulation times so that for each unit that increases the concentration of sheep's milk, the expected coagulation time decreases significantly by 0.05 minutes.
The goodness of the adjustment is given by the adjusted coefficient R^2, which with 63.6% indicates that in this percentage the model explains the variability of the data (Figure 3).
As the concentration of sheep's milk increases (from 60 – 90%), the clotting coagulation time decreases linearly. However, with 100% sheep's milk, coagulation time increases. The reason for this is unknown. The absence of milk of other species might explain a delay in the coagulation time.
The values observed for the coagulation times in the different mixtures vs. those predicted by the model is shown in Figure 4.
The prediction of the model was observed to be quite good, as the values predicted by the model have high concordance with those observed.
The data shows that there is an acceleration of coagulation by the vegetable thistle extract, as the percentage of sheep increases in the milk mixtures considered as acceptable by the DOP of Flor de Guía cheese.
Therefore, it can be assumed that the sensory characteristics of Flor de Guía cheese are affected by the percentages of sheep's milk that the producer intends to use as the raw material for his cheeses, as this will influence the speed of curd formation after the addition of thistle extract as a coagulant. Unfortunately, the samples from the different cheeses produced were not evaluated for sensory characteristics. This may be considered in a future study.
Ordiales et al. (14) observed that a high coagulant activity of the thistle extract after 24 hours of maceration improved the creaminess, viscosity and acceptability in Torta del Casar cheeses, such that the best thistles for the production of these cheeses would be those of greater coagulation activity. This seems to indicate that

incluindo as percentagens (de leite) abrangidas pela DOP do queijo Flor de Guía.
Com base na exploração gráfica destes dados, foi proposto um modelo linear para a variável "tempo de coagulação", dependendo da percentagem de leite de ovelha utilizada, com correcção para a concentração de 100% de leite de ovelha.
O modelo selecionado (melhor regressão de subconjunto e BIC) tem a forma:

$$Tempo\ de\ coagulação = \beta 0 + \beta 1 \cdot \%Ovelha + \beta 2 \cdot (\%Ovelha=100) + e$$

sendo $I(\%Ovelha = 100)$ 1 ou 0 de acordo com $\%Ovelha = 100$ ou não e e o termo do erro.

O termo β1 reflecte a mudança esperada nos tempos de coagulação, de modo que, para cada unidade que aumenta a concentração de leite de ovelha, o tempo esperado de coagulação diminui significativamente em 0,05 minutos.
A qualidade do ajuste é dada pelo coeficiente ajustado R^2, que com 63,6% indica que nessa percentagem o modelo explica a variabilidade dos dados (Figura 3).
À medida que a concentração de leite de ovelha aumenta, o tempo de coagulação diminui linearmente com um efeito inexplicável que ocorre para 100% de leite de ovelha. A ausência de leite de outras espécies pode explicar um atraso no tempo de coagulação.
Os valores observados para os tempos de coagulação nas diferentes misturas vs. os previstos pelo modelo são mostrados na Figura 4.
A previsão do modelo foi observada como bastante boa, pois os valores previstos pelo modelo têm alta concordância com os observados.
Os dados mostram que existe uma aceleração da coagulação pelo extracto de cardo vegetal, pois a percentagem de ovelha aumenta nas misturas de leite consideradas aceitáveis pela DOP do queijo Flor de Guía.
Portanto, pode-se supor que as características sensoriais do queijo Flor de Guía sejam afectadas pelas percentagens de leite de ovelha que o produtor pretende usar como matéria-prima para os seus queijos, uma vez que isso influenciará a velocidade de formação de coalhada após a adição de extracto de cardo como coagulante. Infelizmente, as amostras dos diferentes queijos não foram avaliadas quanto às características sensoriais. Isso pode ser considerado num estudo futuro.
Ordiales et al. (14) observaram que uma alta actividade coagulante do extracto de cardo após 24 horas de maceração melhorou a cremosidade, a viscosidade e a aceitabilidade nos queijos Torta del Casar, de modo que os melhores cardos para a produção desses queijos

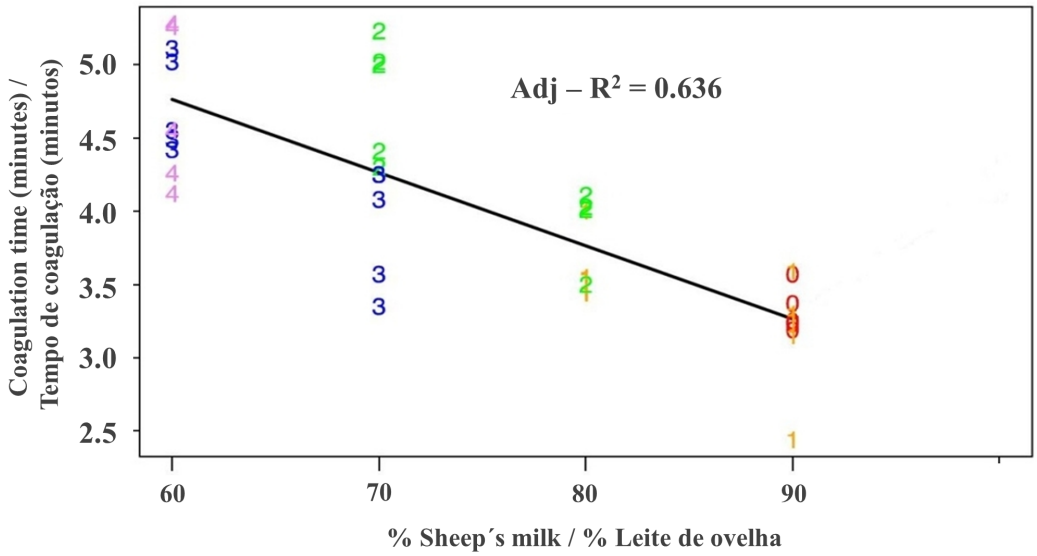


Figure 3 - Coagulation time versus % of sheep milk. The lines correspond to the linear regression. Numbers (x 10) correspond to % of sheep´s milk. The goodness of fit is given by the adjusted R-Square (the model explains the 63.6% of the variability of data). As in Table 1, the colored numbers refer to the percentage of sheep's milk in each mixture. Each color corresponds to a percentage of sheep's milk and the number that is repeated corresponds to one test.

Figura 3 - Tempo de coagulação versus % de leite de ovelha. As linhas correspondem à regressão linear. Os números (x 10) correspondem a % de leite de ovelha. A qualidade do ajuste é dada pelo R-Quadrado ajustado (o modelo explica os 63,6% da variabilidade dos dados). À semelhança da Tabela 1, os números coloridos fazem referência à percentagem de leite de ovelha de cada mistura. Cada cor corresponde a uma percentagem de leite de ovelha e número que se repete corresponde a um ensaio.

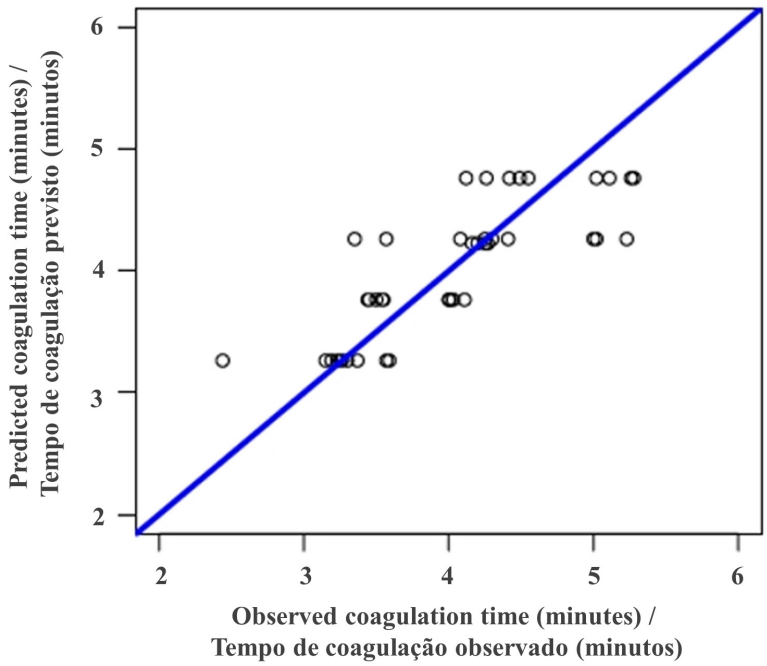


Figure 4 - Predicted coagulation time versus observed coagulation time. The line is the bisector of the first quadrant. The proximity of the points to the line indicates a good fit.

Figura 4 - Tempo de coagulação previsto versus tempo de coagulação observado. A linha é a bissetriz do primeiro quadrante. A proximidade dos pontos com a linha indica um bom ajuste.

high percentages of sheep's milk used by cheesemakers in the production of Flor de Guía cheese might improve the organoleptic appreciation of these cheeses by consumers.

However, the same authors (14) indicated that most vegetable coagulants have a high proteolytic nature, and this excessive activity limits their use in cheese manufacturing, as it can lead to lower cheese yields, bitter tastes, acids, and texture defects. Therefore, in order not to over-accelerate the coagulation process in Flor de Guía cheeses, it would be advisable to use high percentages of sheep's milk, and to use thistle extracts with moderate strength. In this way, cheeses with pleasant sensory characteristics can be obtained, avoiding the appearance of devaluing defects.

There are several factors that related the kind of thistle flower with milk coagulation (or clotting) activity (MCA) due to great variability in the composition, mainly due to the degree of dryness of the thistle used. This dependence on previous drying of flower after harvesting (collection place, drying time, sun exposure, year, etc). Thus, traditional drying procedures seem to affect the flower MCA. In fact, the MCA was significantly lower for dried flower when compared with the non-dried flower (15). In both groups the results for MCA showed a wide variation and this can mean that uncontrolled utilization of thistle flower may be an unfavourable factor for a stable cheesemaking technology compared to the use of extracts.

The results obtained in this study also show that the exclusive use of sheep's milk delays the coagulation time of the thistle extract. This option, which is also available to cheesemakers assigned to this PDO, may be a good decision, since it would be "a way of accelerating the maturation of cheese made with sheep's milk, while preserving all the organoleptic properties of this type of cheese, adding different amounts of enzymes of *C. cardunculus*" (16). Nevertheless, further research studies could address other effects such as the influence of dry thistle, concentration, and the content of protein fractions and microorganisms, on milk composition, coagulation properties, and cheese-making.

seriam aqueles com maior actividade de coagulação. Isso parece indicar que altas percentagens de leite de ovelha usado pelos queijeiros na produção do queijo Flor de Guía podem melhorar a apreciação organoléptica desses queijos pelos consumidores.

No entanto, os mesmos autores (14) indicaram que a maioria dos coagulantes vegetais têm uma alta natureza proteolítica, e essa actividade excessiva limita o seu uso na elaboração de queijos, pois pode levar a menores rendimentos, sabor amargo, ácidos e defeitos de textura. Portanto, para não acelerar o processo de coagulação nos queijos Flor de Guía, seria aconselhável usar altas percentagens de leite de ovelha e usar extractos de cardo com força moderada. Dessa forma, podem ser obtidos queijos com características sensoriais agradáveis, evitando o aparecimento de defeitos de desvalorização.

Existem vários factores que relacionam o tipo de flor de cardo com a actividade de coagulação do leite (ACL), devido à grande variabilidade na composição, principalmente devido ao grau de secagem do cardo utilizado. Isso depende da secagem prévia da flor após a colheita (local de colheita, tempo de secagem, exposição ao sol, ano, etc.). Assim, os procedimentos tradicionais de secagem parecem afectar a ACL da flor. De facto, a ACL foi significativamente menor para flores secas quando comparada com as flores não secas (15). Em ambos os grupos, os resultados da ACL mostraram uma grande variação e isso pode significar que a utilização descontrolada da flor de cardo pode ser um factor desfavorável para uma tecnologia estável de produção de queijo, comparado com a utilização de extractos.

Os resultados obtidos neste estudo também mostram que o uso exclusivo de leite de ovelha atrasa o tempo de coagulação do extracto de cardo. Essa opção, também disponível para os queijeiros designados para esta DOP, pode ser uma boa decisão, pois seria "uma maneira de acelerar a maturação do queijo produzido com leite de ovelha, preservando todas as propriedades organolépticas desse tipo de queijo, adição de diferentes quantidades de enzimas de *C. cardunculus*" (16). No entanto, outros estudos poderiam abordar a pesquisa sobre outros efeitos, como a influência do cardo seco, a concentração, o conteúdo das fracções proteicas e os microrganismos na composição do leite, nas propriedades da coagulação e na produção de queijo.

References / Referências

1. Sanjuán, E. and Fernández- Salguero, J. (1994). Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulacion por cuajo vegetal (*Cynara* sp.). ISSN 0212-1689, n 13-6, p 69-73.
2. Duarte. P, Figueiredo. R, Pereira. S and Pissarra. José. (2006). Canadian Jounral of Botany. Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. 84 (5), 737-749.
3. Sanjuán Velázquez. E and Fernández-Salguero, J. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. Food Chemistry. 64 (2), 177-183.
4. Veríssimo P, Esteves C, Faro C and Pires E (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. Biotechnology Letters. 17 (6), 621-626.
5. Chazarra S, Sidrach L, López-Molina D and Rodríguez-López JN (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymu*s, L.) flowers. International Dairy Journal. 17 (12), 1393-1400.
6. Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M., Pais, M. S., & Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. Journal of bioscience and bioengineering, 105(4), 305-312.
7. Coalho, PRODUCTOS ALIMENTARES, LDA. (2011). Ficha técnica de producto final. Queijo de Azeitão. Consultada el 19 de junio de 2019.https:/coalho.pt/wp-content/uploads/2018/04/ft-pf-01-queijo-de-Azeitão.pdf.
8. Official State Gazette (BOE) (2008). Resolución de 15 de abril de 2008, de la Dirección General de Industria Agroalimentaria y Alimentación, por la que se concede la protección nacional transitoria a la denominación de origen protegida «Queso Flor de Guía y Queso de Guía».
9. Severinsen, S.G., Norman, B.E., Nielsen, T., Wagner, J. (1979). Enzymatic treatment of whey permeate with recovery of enzyme by ultrafiltration, The World Galaxy for the World Dairy Industry, nº 7.
10. R Core Team (2016). R: A language and enviroment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.
11. García. V, Rovira. S, Teruel. R, Boutoial. K, Rodríguez. J, Roa. I and López. M.B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goat's cheese. Dairy Science & Technology. 92 (6), 691-707.
12. García. V, Rovira. S, Boutoial. K and Álvarez. (2015). A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation. Dairy Science and Technology. 95 (2), 197-208.
13. Stocco, G., Pazzola, M., Dettori, M. L., Paschino, P., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2018). Effect of composition on coagulation, curd firming, and syneresis of goat milk. Journal of Dairy Science, 101(11), 9693-9702.
14. Ordiales. E, Benito. Mº. J, Martín. A, Fernández. M, Hernández. A, Córdoba Mº de Guía. (2013). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of 'Torta del Casar' cheese. Journal of Dairy Research. 80 (4), 429-438.
15. Martins, A. L., de Vasconcelos, M. P., & De Sousa, R. B. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. Le Lait, 76(5), 473-477.
16 Galán. E, Prados. F, Tejada. L and Fernández-Salguero. J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. International Dairy Journal. 18 (1), 93-98.

.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Nut. Food Sciences | C. Nut. Alimentação Biomed Biopharm Res., 2020; 17(1): 33-43

doi: 10.19277/bbr.17.1.222

Preliminary sensory evaluation of salty crackers with grape pomace flour

Avaliação sensorial preliminar de bolachas salgadas de farinha de bagaço de uva

M. Lídia Palma [1,2*], M. Cristiana Nunes [1,2,3], Rita Gameiro [2], Marta Rodrigues [2], Sarah Gothe [2], Nelson Tavares [1,2], Cíntia Pego [1], Marisa Nicolai [1,2], Paula Pereira [1,2,4]

[1]Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal; [2]Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal [3]LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal; [4]Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

* Corresponding author: lidia.palma@ulusofona.pt

Abstract

Grape pomace, a by-product of winemaking, contains numerous chemical compounds with high nutritional value and potential benefits for human health, which enable its use for product enrichment in different industries from cosmetics to food. The aim of this study was to incorporate the grape pomace flour of the Touriga Nacional and Arinto grapes varietals from the Alentejo region of Portugal in a recipe for salty crackers, which were submitted to sensory evaluation by applying a hedonic test to 53 individuals. The results of the evaluation show a clear tendency of preference for the crackers with 10% of grape pomace flour, both in the Touriga Nacional and Arinto samples, which presented the highest result averages.

Keywords: grape pomace, salty crackers, sensory evaluation, Touriga Nacional, Arinto

Resumo

O bagaço de uva é o subproduto da vinificação que apresenta na sua constituição diversos compostos químicos com elevado valor nutritivo e potenciais benefícios para a saúde humana, o que viabiliza a sua utilização em diferentes indústrias desde a cosmética à alimentar, através do enriquecimento dos produtos. Este estudo teve assim como objetivo a incorporação de farinhas de bagaço da uva, resultantes da vinificação, das castas Touriga Nacional e Arinto, provenientes da região portuguesa do Alentejo, numa receita de bolachas salgadas, as quais foram submetidas à avaliação sensorial aplicando um teste hedónico a 53 indivíduos. Os resultados da avaliação sensorial revelam uma clara tendência de preferência pelas bolachas com incorporação de 10% de farinha de bagaço, tanto na amostra contendo Touriga Nacional como na amostra contendo Arinto, na medida em que foram as que apresentaram os parâmetros mais elevados.

Palavras-chave: bagaço de uva, bolachas salgadas, avaliação sensorial, Touriga Nacional, Arinto

Received / *Recebido*: 09/11/2019
Accepted / *Aceite*: 25/03/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

In Portugal the wine industry is one of the main industries, not only in terms of production (6.1 million hectolitres of wine in 2018) but also in terms of trade balance (8,041,480 € of exports), making Portugal the eleventh largest wine producer in the world (1).

However, the industrial production of wine generates a large volume of waste which, according to the International Wine Organization (2), corresponds to 25% of the weight of the grape. Thus, the annual wine production in Portugal creates around 200 kilotons/year of winemaking residue, which is called grape pomace (3). Regulation (EC) 1493/1999 defines the grape pomace as the residue resulting from the pressing of fresh grapes, whether fermented or not during the winemaking process, constituted of stalks, stems, films, and grains. Depending on the grape pomace variety and the method used in winemaking, a red/fermented grape pomace or a sweet/fresh grape pomace can be obtained. In the production of white wines, the resulting sweet/fresh grape pomace does not ferment along with the must and thus the wine has low alcohol content and high sugar content. Conversely, red/fermented grape pomace ferments together with the must to produce a wine with higher alcohol and lower sugar content (3). After winemaking, the waste produced can be used as fertilizer, as a raw material for the production of spirits and of tartaric acid, or disposed of in landfills, the latter being the least sustainable and with equally negative environmental consequences (4-6).

Given the growing interest in environmental preservation and in view of the economic value generated by this industry, the sustainable use of these wastes is imperative. Based on several studies, which highlight various components of great relevance from a nutritional point of view, grape pomace may, from this perspective, be used for human consumption. In this sense, after drying and grinding, the resulting by-products may give rise to a grape pomace flour rich in fibre, proteins, polyphenols, and antioxidant compounds (7-9).

Therefore, in this study this residue is proposed to be used in a sustainable, economical, environmentally, and socially advantageous manner through the incorporation of grape pomace flour into food for human consumption, namely salty crackers. In this way, conventional wheat flour is replaced by grape pomace flour, at percentages of 5% and 10% (w/w), to nutritionally enrich the food. The resulting different crackers were then subjected to sensory evaluation with untrained tasters (10).

Introdução

Em Portugal a indústria vitivinícola é das principais indústrias, não só em termos produtivos (6,1 milhões de hectolitros de vinho em 2018), como em termos de balanço comercial (8.041.480 € em exportações), dados que fazem de Portugal o décimo primeiro produtor mundial de vinho (1).

A produção industrial de vinho gera contudo, um grande volume de resíduos que, segundo a Organização Internacional de Vinho (2), correspondem a 25% do peso da uva. Deste modo, a produção anual de vinho em Portugal origina, cerca de 200kilotoneladas/ano de resíduo da vinificação, o qual se designa por bagaço de uva (3). No Regulamento (CE) 1493/1999 estabelece-se como bagaço, o resíduo resultante da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não, durante o processo de produção de vinho, constituído por engaços, pedúnculos, películas e grainhas. Dependendo da casta e do método utilizado na vinificação, pode obter-se um bagaço tinto/fermentado ou um bagaço doce/fresco. Por um lado, na produção de vinhos brancos o bagaço resultante doce/fresco, não fermenta juntamente com o mosto e por isso o bagaço apresenta um baixo teor de álcool e elevado teor de açúcar. Por outro lado, o bagaço tinto/fermentado, fermenta em conjunto com o mosto dando origem a um bagaço com um teor de álcool mais elevado e menor teor de açúcar (3). Após a vinificação, os resíduos produzidos podem ser utilizados como fertilizantes, matéria-prima na produção de aguardentes e produção de ácido tartárico ou serem descartados em aterros, este último exemplo é não só menos sustentável e com consequências ambientais igualmente negativas (4-6).

Dado o crescente interesse na preservação ambiental e tendo também em vista o valor económico gerado por esta indústria, é imperativo o uso sustentável destes resíduos. Tendo por base diversos estudos, onde se realçam vários componentes de grande relevância do pondo de vista nutricional, o bagaço pode, nesta perspetiva, vir a ser utilizado na alimentação humana. Neste sentido, após secagem e moagem, a farinha de bagaço de uva resultantes dá origem a uma, rica em fibras, proteínas, polifenóis e compostos antioxidantes (7-9).

Assim, na sequência de diversas pesquisas que foram levadas a cabo, é proposto neste estudo a utilização deste resíduo de forma sustentável, económica, ambiental e socialmente vantajosa através da incorporação da farinha de bagaço de uva num alimento para consumo humano, nomeadamente bolachas salgadas. Desta forma, substitui-se a farinha de trigo convencional pela

With the aim to assess the acceptability of the salty crackers, a preliminary sensory evaluation was used, as there are important advantages in the use of these tests with regard to the perception of the most relevant quality attributes for consumer acceptability. These tests are therefore universally used in order to determine the global preferences of consumers (11).

Material and Methods

Biological samples

Grape pomace samples of the Arinto and Touriga Nacional varieties were supplied by Adega Cooperativa Carmim, in Reguengos de Monsaraz, Alentejo, Portugal, corresponding to a white and red grape, respectively.

Cracker preparation

The formulation used in this study was produced according to a previously developed recipe (12). This recipe was used to prepare salty crackers without grape pomace flour, which were used as a control in this study, and was also used to produce the four other salty crackers containing grape pomace flour. All ingredients used are shown in Table 1.

Four different formulations were prepared with incorporation of grape pomace: cracker with 5% incorporation of Arinto variety flour (Arinto 5%); cracker with 10% incorporation of Arinto variety flour (Arinto 10%); cracker with 5% incorporation of Touriga Nacional variety flour (Touriga Nacional 5%); and cracker with 10% incorporation of Touriga Nacional variety flour (Touriga Nacional 10%) (Table 1).

Ingredients used included T55 Extra fine wheat flour (Nacional), refined white sugar (Sidul), fine table salt (Continente), sunflower oil (Fula), sodium bicarbonate (Royal), distilled water, and grape pomace flour.

To begin, all ingredients were added and mixed in a food processor (Bimby, Vorwerk), at position 4, for 2 min, to form a homogeneous dough. The dough was subsequently flattened in a manual rolling mill (Atlas, Marcato) at positions 2, 4, and 6. This step was repeated three times for each position. Then the dough was cut into a rectangular shape (2.5 cm × 2 cm) and allow to rest for 10 min, followed by baking in an electric oven (Arianna) at 160° C for 15 min. Finally, the crackers were dried at 60º C for 30 min. The procedure used is described in Figure 1.

farinha de bagaço de uva, numa percentagem de 5% e 10% (m/m), de modo a enriquecer nutricionalmente o alimento. As diferentes bolachas salgadas resultantes, foram de seguida submetidas a uma avaliação sensorial preliminar com participantes provadores não treinados (10).

Com vista a avaliar a aceitabilidade dos alimentos confecionados, recorreu-se a uma avaliação sensorial, visto existirem importantes vantagens na utilização destes testes no que concerne à perceção de atributos de qualidade mais relevantes para a posterior aceitação por parte do consumidor. Estes testes são por isso universalmente usados de modo a determinar as preferências globais dos consumidores (11).

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

As amostras de bagaço de uva das variedades de Arinto e Touriga Nacional foram fornecidas pela Adega Cooperativa Carmim, em Reguengos de Monsaraz, Alentejo, correspondendo a uma casta branca e uma tinta, respetivamente.

Preparação das bolachas

A formulação utilizada foi produzida de acordo com uma receita previamente desenvolvida (12). A receita original, sem farinha de bagaço de uva, foi usada como controlo, e para produzir as formulações contendo farinha de bagaço de uva. Todos os ingredientes constam na Tabela 1. Foram preparadas quatro formulações, com diferentes incorporações de farinha de bagaço da uva: bolacha com 5% de incorporação de farinha da casta Arinto (Arinto5%); bolacha com 10% de incorporação de farinha da casta Arinto (Arinto10%); bolacha com 5% de incorporação de farinha de bagaço da casta de Touriga Nacional (Touriga 5%); e bolacha com 10% de incorporação de farinha de bagaço da casta de Touriga Nacional (Touriga 10%) (Tabela 1).

Os ingredientes utilizados incluíram: farinha de trigo T55 extrafina (Nacional), açúcar branco refinado (Sidul), sal fino de mesa (Continente), óleo de girassol (Fula), bicarbonato de sódio, (Royal), água destilada e farinha de bagaço de uva.

Inicialmente todos os ingredientes foram adicionados e misturados num processador de alimentos (Bimby, Vorwerk), na posição 4, durante 2 min, para a formação de uma massa homogénea. Esta foi posteriormente moldada na laminadora manual (Atlas, Marcato) nas posições 2, 4 e 6. Repetiu-se esta etapa três vezes para cada posição. De seguida, a massa foi cortada em for-

Table 1 - Formulation of salty crackers ingredients
Tabela 1 - Ingredientes da formulação das bolachas salgadas

Ingredients / Ingredientes	Control / Controlo	5% Incorporation / Incorporação	10% Incorporation / Incorporação
	Quantity / Quantidade (g)		
Wheat flour Farinha de Trigo	91.00 ± 0.01	83.50 ± 0.01	76.00 ± 0.01
White sugar Açúcar branco	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01
Fine salt Sal fino	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01
Baking poder Fermento químico	2.25 ± 0.01	2.25 ± 0.01	2.25 ± 0.01
Sunflower oil Óleo de girassol	11.25 ± 0.01	11.25 ± 0.01	11.25 ± 0.01
Destilled Water Água destilada	42.50 ± 0.01	42.50 ± 0.01	42.50 ± 0.01
Grape pomace flour Farinha de bagaço de uva	-	7.50 ± 0.01	15.00 ± 0.01

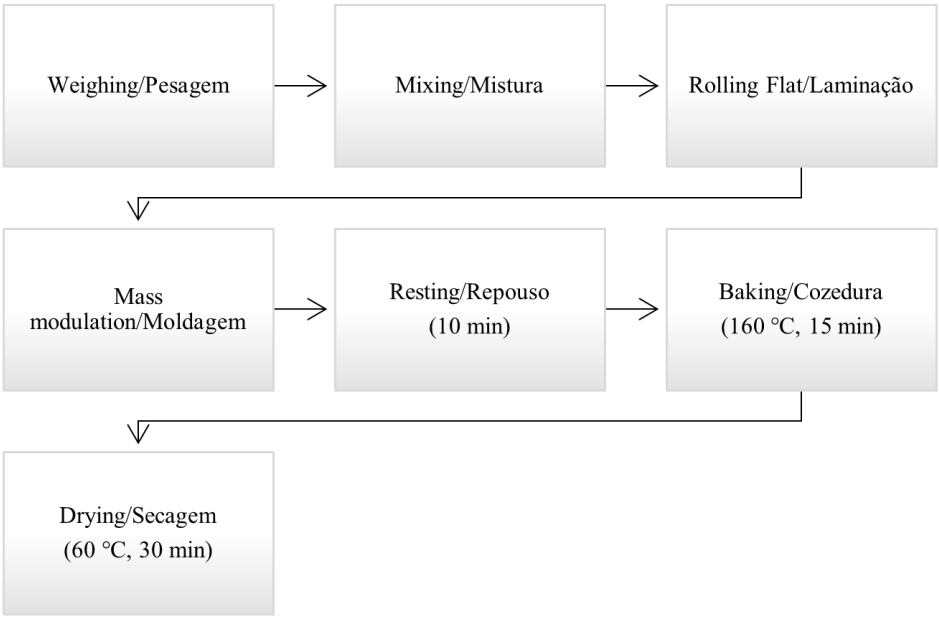


Figure 1 Preparation of salty crackers with incorporation of grape pomace flour
Figura 1 - Preparação de bolachas salgadas com incorporação de farinha de bagaço

Table 2 - Hedonic and purchase scales
Tabela 2 - Escalas hedónica e compra

	Hedonic / Hedónica	*Purchase / Compra*
5	Very pleasant / Muito agradável	Certainly buy / Compraria de certeza
4	Pleasant / Agradável	Would probably buy / Provavelmente compraria
3	Indifferent / Indiferente	Don´t know if I would buy / Não sei se compraria
2	Unpleasant / Desagradável	Probably wouldn´t buy / Provavelmente não compraria
1	Very unpleasant / Muito desagradável	Certainly wouldn´t buy / Não compraria de certeza

Sensory evaluation

The use of trained tasting panels is more typical for conducting descriptive testing, and the use of untrained panels may be suitable for the technique of free-choice profiling (13,14). In this study, a preliminary sensory evaluation was made. A group of 53 untrained individuals, mainly researchers and students, voluntarily joined the evaluation, which included tasting of the salty crackers and a survey.

Although the frequency scale most used is the nine-point scale by Meilgaard (13), the 5-point scale proposed by Moskowitz (14) proved to be more appropriate (15). The attributes evaluated in this evaluation were colour, aroma, flavour, texture, and overall impression, using a 5-point hedonic scale (Table 2). The intention to purchase was also parameterized according to a 5-point scale, shown in Table 2.

At the end of the survey, the participants choose that which they "best like" and the one they "least like" among all of the crackers.

Statistical analysis

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

ma retangular (2,5 cm × 2 cm) e repousou por 10 min, seguindo para a cozedura no forno elétrico (Arianna), a 160 °C durante 15 min. Por fim, procedeu-se à secagem na estufa a 60 °C (Arianna), durante 30 min. O procedimento utilizado encontra-se descrito na Figura 1.

Avaliação sensorial

A utilização de painéis de provadores treinados é mais usual para conduzir testes do tipo descritivo e o uso de painéis não treinados, mais apropriados para a técnica de perfil de escolha-livre (13-14). Neste estudo foi realizado um estudo preliminar de avaliação sensorial com um grupo de 53 indivíduos não treinados, sobretudo investigadores e estudantes que aderiram voluntariamente à avaliação sensorial que incluiu a prova das bolachas e preenchimento de um inquérito.

Embora a escala de frequência mais utilizada seja a escala de nove pontos de Meilgaard (13) esta foi substituída pela escala de 5 pontos proposta por Moskowitz (15) que mostrou ser mais adequada (11). Os atributos avaliados nesta avaliação sensorial foram cor, aroma, sabor, textura e impressão global, recorrendo a uma escala hedónica de 5-pontos (Tabela 2). A intenção de compra foi igualmente parametrizada segundo uma escala com 5-pontos, que consta na Tabela 2. No final do inquérito foi solicitado aos participantes que escolhessem entre todas as bolachas avaliadas a que "gostei mais" e a que "gostei menos".

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 Pearson $\chi 2$ para variáveis categóricas ou testes t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado, para variáveis contínuas. Todos os testes estatísticos foram bicaudais e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. To-

Results and Discussion

The participants in the present analyses included 53 individuals, of which 71.70% were females from 19 to 83 years old, and 28.30% were males from 14 to 72 years old. Mean age according to gender is shown in Table 3.
Grape pomace crackers feature an attractive look and colour characteristic of wine products, particularly in the case of Touriga Nacional. The coloration depends on the type of grape pomace variety used, with violet tones in the case of Touriga Nacional and brown tones in the case of Arinto. These features can be observed in Figure 2.
According to the results observed in Table 4 regarding the sensorial analysis of the different types of crackers, the Arinto 10% cracker clearly had the highest score of colour, flavour, texture, global appreciation, and purchase intention, compared to the rest of the crackers with different incorporation and/or variety. However, none of these results were statistically significant, and this may be due to the small sample included.
The results regarding the sensory parameters evaluated are shown in Figure 3, and the results obtained in relation to purchasing intention are shown in Figure 4.

das as análises foram realizadas utilizando o software SPSS versão 26.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados e Discussão

Os participantes neste estudo incluíram 53 indivíduos, sendo 71,70% do sexo feminino, de 19 a 83 anos, e 28,30% do sexo masculino, de 14 a 72 anos. A média de idade de acordo com o sexo pode ser observada na Tabela 3.
As bolachas de bagaço de uva apresentam uma aparência atraente e característica da cor dos produtos vitivinícolas que lhe deram origem, em especial a de bagaço de Touriga Nacional. A coloração depende da casta de bagaço de uva utilizada, com tons violetas no caso da Touriga Nacional e tons marrons no caso da Arinto. Todos esses resultados podem ser observados na Figura 2.
De acordo com os resultados observados na Tabela 4 em relação à avaliação sensorial dos diferentes tipos de bolachas, fica claro que as de 10% da Arinto são as que apresentam maior pontuação de cor, sabor, textura, valorização global e intenção de compra, comparados para o resto das bolachas com incorporação e/ou variedade diferentes. No entanto, nenhum desses resultados foi estatisticamente significativo, o que pode ser devido à pequena amostra estudada.
A Figura 3 apresenta os resultados referentes aos

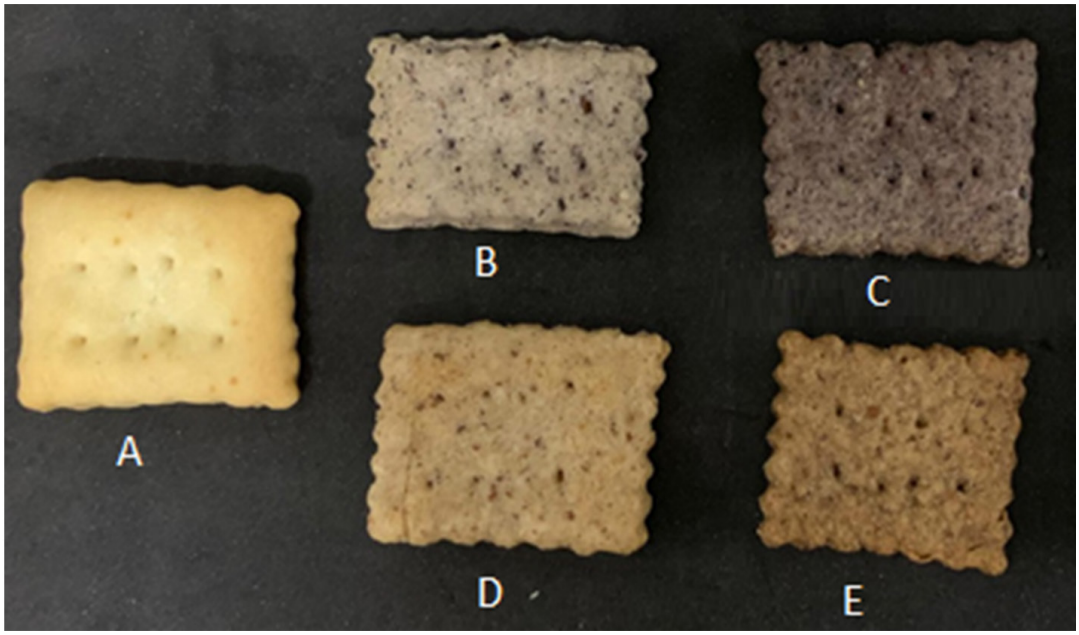


Figure 2 - Control cracker, without incorporation of grape pomace, (A); crackers with flour incorporation of the Touriga Nacional 5% (B) and 10% (C), crackers with flour incorporation of the Arinto 5% (D) and 10% (E).
Figura 2 - Bolacha controlo, sem incorporação de bagaço, (A); bolachas com incorporação de farinha da casta Touriga Nacional 5% (B) e 10% (C), bolachas com incorporação de farinha da casta Arinto 5% (D) e 10% (E)

Table 3 - Mean age according to gender. Age expressed as means (standand deviation/SD). *p values for comparisons between groups were tested by Student's t-test
Tabela 3 - Idade expressa em média (desvio padrão/DP). *Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante teste t de Student.

	All population / População tot. (n=53)	**Men / Homem** (n=15)	**Women / Mulher** (n=38)	***p-value* / Valores P****
Age/ idade, years/ anos	43.96 (13.08)	44.07 (14.76)	43.92 (12.57)	*0.971*

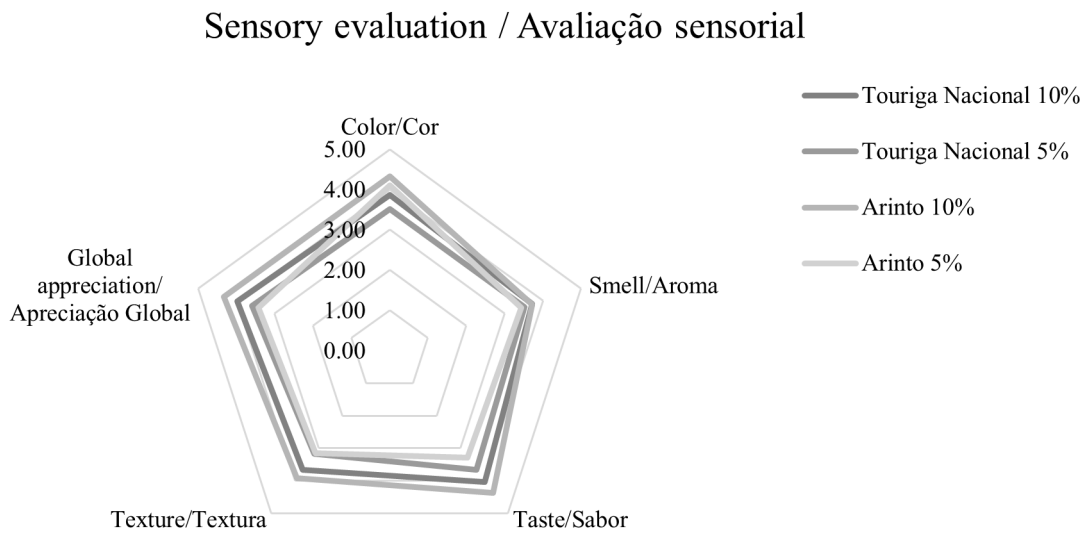


Figure 3 - Responses obtained from the participants (n = 53) in the sensory evaluation for 5% and 10% Touriga Nacional salty crackers, and 5% and 10% Arinto. 1 - "very unpleasant," 2 - "unpleasant," 3 - "indifferent," 4 - "pleasant," 5 - "very pleasant"
Figura 3 - Respostas obtidas do painel de participantes (n = 53), para bolachas salgadas de Touriga Nacional 5% e 10%, e Arinto 5% e 10%. 1 - "muito desagradável," 2 - "desagradável," 3 - "indiferente," 4 - "agradável," 5 - "muito agradável"

According to the results in Figure 3, the most appreciated crackers were 10% Arinto, with average overall values of 4.32 in colour, 3.72 in aroma, 4.32 in flavour and 3.92 in texture. The Touriga Nacional 10% cracker was the second most appreciated, with average values of 3.87 in colour, 3.73 in aroma, 4.03 in flavour and 3.67 in texture. The lower incorporation levels were less accepted, with the Arinto 5% having the worst attributes, with a global average value of 4.10 for colour, 3.43 for aroma, 2.29 for flavour and 3.14 for the texture. The Touriga Nacional 5% registered 3.52 for colour, 3.52 for flavour, 3.66 for flavour, and 3.17 for texture.

The "like best" and "like least" choice for the four crackers are presented in Table 5. The individuals included in the analysis reported that the cracker that they "best like" was the Touriga 10% with 39.60% of the total evaluation and the cracker that they "least like" was the Touriga 5% with 41.50%. It is important

parâmetros sensoriais avaliados e a Figura 4 os resultados obtidos em relação à intenção de compra.

De acordo com os resultados da figura 3, as bolachas mais apreciadas foram as de 10% Arinto, com valores gerais médios de 4,32 em cores, 3,72 em aroma, 4,32 em sabor e 3,92 em textura. As de 10% Touriga Nacional com valores médios de 3,87 em cores, 3,73 em aroma, 4,03 em sabor e 3,67 em textura foram os segundos mais apreciados. Os níveis de incorporação menor foram menos aceites, sendo o Arinto 5% a fórmula com os piores atributos, com valor médio global de 4,10 para cor, 3,43 para aroma, 2,29 para sabor e 3,14. para a textura. A Touriga Nacional 5% registou 3,52 para cor; 3,52 para sabor, 3,66 para sabor e 3,17 para textura.

A escolha da bolacha que "gostei mais" e da que "gostei menos" está apresentada na Tabela 5. Os indivíduos incluídos na análise escolheram que a bolacha "Touriga 10%" com 39,60% da avaliação total como a que

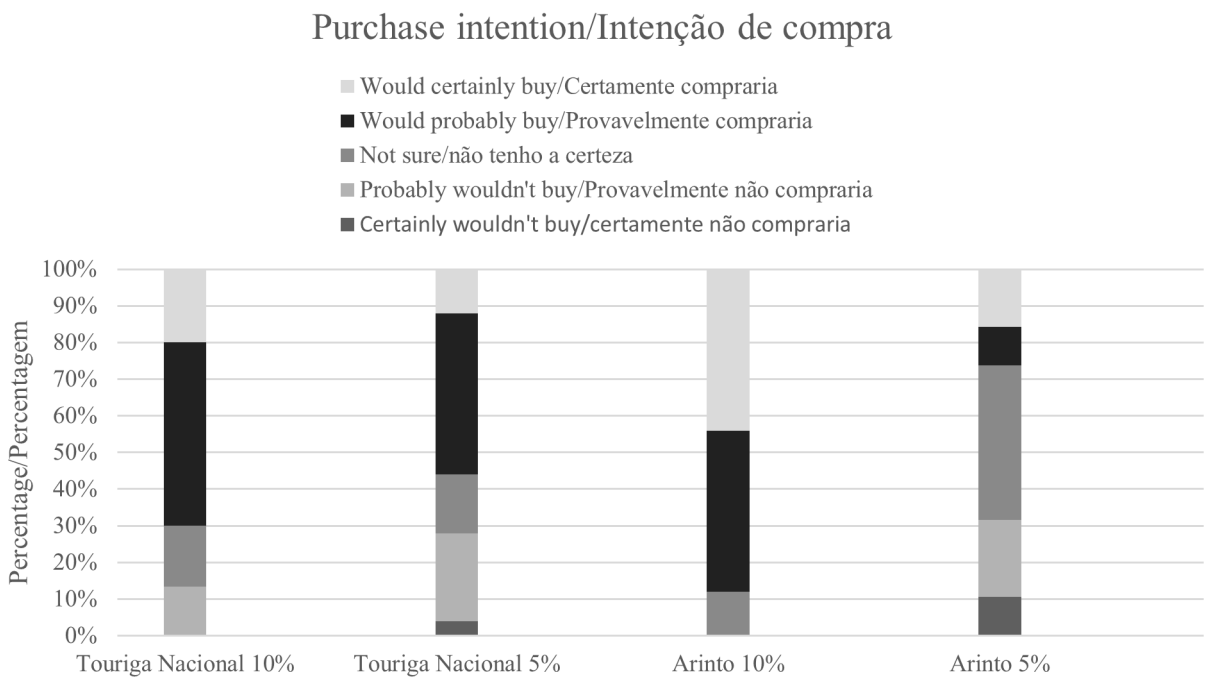


Figure 4 - Responses obtained from the tasters (n = 53) in the sensory evaluation in relation to purchasing intention, for 5% and 10% Touriga Nacional salty crackers, and 5% and 10% Arinto crackers

Figura 4 - Resultados obtidos na avaliação sensorial (n = 53) em relação à intenção de compra, para bolachas salgadas de Touriga Nacional 5% e 10% e Arinto 5 e 10%

	Control / Controlo (n=41)	**Touriga Nacional 10%** (n=30)	**Touriga Nacional 5%** (n=29)	**Arinto 10%** (n=25)	**Arinto 5%** (n=21)	**p-value*/ *Valores P****
Colour / Cor	3.46 (0.75)	3.87 (0.78)	3.52(0.57)	4.32 (0.69)	4.10 (0.83)	*0.097*
Flavour / Aroma	3.17 (0,70)	3.73 (0.83)	3.52 (0.63)	3.72 (0.84)	3.43 (0.60)	*0.153*
Taste / Sabor	3.15 (0.79)	4.03 (0.81)	3.66 (0.72)	4.36 (0.64)	3.29 (0.72)	*0.168*
Texture / Textura	2.95 (1.02)	3.67 (1.09)	3.17 (0.85)	3.92 (0.95)	3.14 (1.20)	*0.172*
Global appreciation / Apreciação global	3.07 (0.85)	3.97 (0.89)	3.59 (0.73)	4.32 (0.56)	3.43 (0.75)	*0.089*
Purchase intention / Intenção de compra	2.78 (1.14)	3.87 (0.94)	3.34 (1.11)	4.32 (0.69)	3.00 (1.18)	*0.074*

Table 4 - Sensory evaluation according the diferent incorporation and varities. Data expressed as means (SD). *p-values for comparisons between groups were tested by Pearson $\chi 2$. Score: Color, Aroma, Flavor, Texture, Global impression=1-Very unpleasant, 2-Unpleasant, 3-Indifferent, 4-Pleasant, 5-Very pleasant; Purchase intention=1-Certainly wouldn't buy, 2-Probably wouldn't buy, 3-Don't know if I would buy, 4-Would probably buy, 5-Ceratainly buy.

Tabela 4 - Análise sensorial de acordo as diferentes incorporações e castas. Dados expressos em médias (SD). *Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante Pearson $\chi 2$. Pontuação: Cor, Aroma, Sabor, Textura, Impressão global=1-Muito desagradável, 2-Desagradável, 3-Indiferente, 4-Agradavél, 5-Muito agradável; Intenção de compra=1-Não compraria de certeza, 2-Provavelmente não compraria, 3-Não sei se compraria, 4-Provavelmente compraria, 5- Compraria de certeza.

Table 5 - Best and least liked crackers choice results. Data expressed as percentage (n). *p-values for comparisons between groups were tested by Pearson χ2

Tabela 5 - Resultados da escolha da bolacha que mais e menos gostaram. Dados expressos como percentagem (n). *Valores P para comparações entre grupos foram testados mediante Pearson χ2

	Touriga Nacional 10%	Touriga Nacional 5%	Arinto 10%	Arinto 5%	p-value* / Valores P*
Best like /Gostei mais (n=48)	39.60 (21)	9.40 (5)	34.0 (18)	7.50 (4)	*0.864*
Least like / Gostei menos (n=48)	13.20 (7)	41.50 (22)	5.70 (3)	30.20 (16)	*0.732*

to remind that these results are different from those observed in Table 4, where Arinto 10% obtained the highest score in most of the parameters because more individuals were tasting Touriga crackers than Arinto crackers. Nevertheless, these differences can also be explained by the fact that the individual may behave differently when faced with a sensory evaluation with several attributes and with a hedonic scale of several points or when an emotional response of like or dislike is requested (16).

Conclusion

This preliminary evaluation made it possible to understand a possible trend in the national market related to different incorporations of grape pomace flour of the Touriga Nacional and Arinto varietals in salty crackers. The results show a greater preference in terms of the parameters evaluated (colour, flavour, texture, purchase intention, and global appreciation) for crackers with the incorporation of 10% flour in both varieties. Considering the appreciation of the participants, the results indicated that the use of these residues has potential for use as an ingredient in food enrichment since the most accepted and most appreciated crackers were those with the highest percentage of grape pomace flour incorporation. Therefore, it would be interesting to increase the percentage of incorporation of this ingredient in the future, with a view to promoting an increase in the nutritional value of products for human consumption. Similar studies involving the incorporation of this type of flour from different grape varietals and food matrices also showed a high level of high acceptance (17,18), although Acun and Gül (19) have emphasized that foods with more than 10% incorporation of grape pomace flour have decreasing acceptance. Based on the description of the different matrices previously studied and this preliminary study, we consider, with a view to

"gostei mais" e "Touriga 5%" como a que "gostei menos" com 41,50%. É importante ressaltar que esses resultados são diferentes dos observados na Tabela 4, onde o "Arinto 10%" obteve a pontuação mais alta na maioria dos parâmetros, não só porque houve mais pessoas provando bolachas Touriga do que bolachas Arinto, mas também porque, quando é solicitada uma resposta emocional do tipo "gosto" ou "não gosto", o indivíduo pode comportar-se de maneira diferente quando confrontado com uma avaliação sensorial com vários atributos e com uma escala hedônica de vários pontos (16).

Conclusão

A avaliação preliminar realizada permite compreender uma possível tendência do mercado nacional relacionada com diferentes incorporações de farinha de bagaço de uva das variedades Touriga Nacional e Arinto em biscoitos salgados. Os resultados mostram uma maior preferência em termos dos parâmetros avaliados (cor, sabor, textura, intenção de compra e valorização global) pelos biscoitos com incorporação de 10% de farinha em ambas as variedades. Considerando a apreciação do participante, os resultados indicaram que a utilização destes resíduos apresenta potencial para uso como ingrediente no enriquecimento de alimentos, uma vez que, os biscoitos mais aceitos e mais apreciados foram aqueles com maior percentagem de incorporação de farinha de bagaço de uva. Seria, portanto, interessante aumentar a percentagem de incorporação no futuro, com vistas a promover o aumento do valor nutricional deste potencial ingrediente para o consumo humano, uma vez que outros estudos semelhantes, realizados com a incorporação deste tipo de farinha, mas com diferentes variedades e matrizes alimentares, mostraram também um elevado nível alto nível de aceitação (17,18), embora Acun e Gül (19) tenham enfatizam que

consolidating the results obtained, the realization of a new study with incorporation greater than 10%, with a significantly larger number of participants, and with groups of trained tasters.

Conflict of Interest

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

Author Contributions Statement

MLP - study design, writing
MN - supervision, final revision
PP- data analysis, supervision
RG, MR, SG - implementation
NT, MCN - revision
CP - statistical analysis

alimentos com incorporação de farinha de bagaço de uva superior a 10% têm aceitação decrescente. Com base no descrito para diferentes matrizes já estudadas e este estudo preliminar, consideramos, com vistas à consolidação dos resultados obtidos, a realização de um novo estudo com incorporação superior a 10%, com um número significativamente maior de participantes, e com grupos de provadores treinados.

Conflito de Interesses

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

Declaração de Contribuições do Autor

MLP - desenho do estudo, redação
MN - supervisão, revisão final
PP - análise de datos, supervisão
RG, MR, SG - implementação
NT, MCN - revisão
CP - análise estatística

References / Referências

1. IVV, "IVV // Vinha," Estatistica/Produção 2019, 2019. [Online]. Available: https://www.ivv.gov.pt/np4/35/. [Accessed: 26-Oct-2019].
2. OIV, "International Organisation of Vine and Wine," Report, 2017. [Online]. Available: http://www.oiv.int/. [Accessed: 08-Nov-2017].
3. L. M. L. R. Silva, "Caracterização dos subprodutos da vinificação," Spectrum, vol. 28, pp. 123–133, 2003.
4. M. Nicolai, P. Pereira, P. Rijo, O. Amaral, A. Amaral, and L. Palma, "Vitis vinera L. pomace: chemical and nutritional characterization," J. Biomed. Biopharm. Res., vol. 15, no. 2, pp. 156–166, 2018.
5. J. Garcia-Lomillo and M. L. González-SanJosé, "Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions," Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., vol. 16, no. 1, pp. 3–22, 2017.
6. A. B. B. Bender et al., "Obtenção e caracterização de farinha de casca de uva e sua utilização em snack extrusado," Brazilian J. Food Technol., vol. 19, no. 0, pp. 1–9, 2016.
7. L. F. Ribeiro, R. H. Ribani, T. M. G. Francisco, A. A. Soares, R. Pontarolo, and C. W. I. Haminiuk, "Profile of bioactive compounds from grape pomace (Vitis vinifera and Vitis labrusca) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses," J. Chromatogr. B, vol. 1007, pp. 72–80, Dec. 2015.
8. A. C. Jacques, F. M. Oliveira, J. V Hernandes, and E. F. Silva, "Elaboração de Farinha de uva Utilizando bagaço da indústria Vitivinícola: efeito sob os compostos fenólicos," 2014.
9. R. Walker, A. Tseng, G. Cavender, A. Ross, and Y. Zhao, "Physicochemical, Nutritional, and Sensory Qualities of Wine Grape Pomace Fortified Baked Goods," J. Food Sci., vol. 79, no. 9, pp. S1811–S1822, 2014.
10. V. Kuchtová, J. Karovičová, Z. Kohajdová, L. Minarovičová, and V. Kimličková, "Effects of white grape preparation on sensory quality of cookies," Acta Chim. Slovaca, vol. 9, no. 2, pp. 84–88, 2016.
11. D. M. Barrett, J. C. Beaulieu, and R. Shewfelt, "Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: Desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing," Crit. Rev. Food Sci. Nutr., vol. 50, no. 5, pp. 369–389, 2010.
12. A. P. Batista et al., "Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers," Foods, vol. 8, no. 12, 2019.
13. C. T. Meigaard Morten, Civille Gail, Sensory Evaluation Techniques - CRC Press Book, 5th ed. CRC Press, 2015.
14. T. A. H. Roland P. Carpenter, David H. Lyon, Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control, 2th ed. Aspen, 2000.
15. H. R. Moskowitz, J. H. Beckley, and A. V. A. Resurreccion, Sensory and consumer research in food product design and development, 2nd ed. IFT Press Wiley-Blakwell, 2012.
16. G. V. Civille and K. N. Oftedal, "Sensory evaluation techniques - Make 'good for you' taste 'good,'" Physiol. Behav., vol. 107, no. 4, pp. 598–605, 2012.
17. G. C. Strapasson, "Caracterização e Utilização do Resíduo de Produção de Vinho no Desenvolvimento de Alimentos com Propriedade Funcional Curitiba , 2016," Universidade Federal do Paraná, 2016.
18. C. Beres et al., "Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review," Waste Management. 2017
19. S. Acun and H. Gül, "Effects of grape pomace and grape seed flours on cookie quality," Qual. Assur. Saf. Crop. Foods, vol. 6, no. 1, pp. 81–88, Mar. 2014.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Nut. Food Sciences | C. Nut. Alimentação Biomed Biopharm Res., 2020; 17(1): 44-47

doi: 10.19277/bbr.17.1.223

Gastroesophageal reflux (Clinical case)

Refluxo gastroesofágico (Caso clínico)

Ariana Saraiva [1], António Raposo [2*]

[1]Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal.; [2]CBIOS (Research Center for Biosciences and Health Technologies), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

* Corresponding author: antonio.raposo@ulusofona.pt

Received / *Recebido*: 17/04/2019
Accepted / *Aceite*: 30/09/2019
Electronic Edition: www.alies.pt

A 53-year-old businesswoman, who has constant heartburn complaints, especially after meals. She was sent to the Nutrition Consultation by the general practitioner for gastroesophageal reflux, who medicated her with the antacid Maalox.

Uma empresária de 53 anos de idade, com queixas constantes de azia, principalmente após as refeições. Ela foi encaminhada à Consulta de Nutrição pelo clínico geral devido a refluxo gastroesofágico, que lhe medicou o antiácido Maalox.

Anthropometric evaluation

Weight: 76.7 kg
Height: 160 cm
BMI: 29.96 kg/m2
Waist circumference: 86 cm

Assessment of body composition (TANITA BC-545N)
Body fat: 42.8 %
Total body water: 42 %

Avaliação antropométrica

Peso: 76,7 kg
Altura: 160 cm
IMC: 29,96 kg / m2
Circunferência da cintura: 86 cm

Avaliação da composição corporal (TANITA BC-545N)
Gordura corporal: 42,8%
Água corporal total: 42,0%

Analytical Parameters:

Hematology

Leukocytes: $5.6x10^9$/L (4.0-10.0)
Erythrocytes: $4.9x10^{12}$/L (3.9-5.2)
Hemoglobin: 15.4 g/dL (12.0-16.0)
Hematocrit: 44.4% (34.7-46.0)
Glycated hemoglobin (A1C): 4.7% (4.0-6.0)

Biochemistry

Glucose: 75 mg/dL (50-100)
Urea: 38 mg/dL (< 50)
Creatinine: 0.68 mg/dL (up to 1.20)
Uric acid: 4.4 mg/dL (2.4-6.0)
Total cholesterol: 165 mg/dL (< 200)
HDL cholesterol: 76 mg/dL (> 59)

Parâmetros analíticos:

Hematologia

Leucócitos: $5,6x10^9$ / L (4,0-10,0)
Eritrócitos: $4,9x10^{12}$ / L (3,9-5,2)
Hemoglobina: 15,4 g / dL (12,0-16,0)
Hematócrito: 44,4% (34,7-46,0)
Hemoglobina glicada (A1C): 4,7% (4,0-6,0)

Bioquímica

Glicose: 75 mg / dL (50-100)
Ureia: 38 mg / dL (<50)
Creatinina: 0,68 mg / dL (até 1,20)
Ácido úrico: 4,4 mg / dL (2,4-6,0)
Colesterol total: 165 mg / dL (<200)
Colesterol HDL: 76 mg / dL (> 59)

LDL cholesterol: 90 mg/dL (up to 130)
Triglycerides: 47 mg/dL (up to 150)
Alanine Aminotransferase: 48 U/L (up to 45)
Aspartate Aminotransferase: 43 U/L (up to 32)
Gama Glutamyltransferase: 15 U/L (up to 42)
Iron: 113 µg/dL (60-170)

Endocrinology

Thyroid Function:
Free T4: 0.9 ng/dL (0.7-1.8)
TSH: 2.3 mUI/L (0.4-4.2)

Anemia

Ferritin: 56.6 µg/L (50.0-200.0)
Folic Acid: 14.4 µg/L (> 4.5)
Vitamin B12: 639 ng/L (> 200)

Clinical evaluation:

Medication (symptomatic):
Maalox antacid

Intestinal transit: regular

Eating habits:
Wake up: 7:00 a.m.
Breakfast: black tea and toast with honey and walnuts
During morning: 1 espresso coffee with 1 packet of sugar
Lunch: 12:30 p.m.
Dish: Half a plate of white rice or pasta or 2 potatoes + meat or fish (140 g) + cooked vegetables (30g)
Drink red wine (250 ml)
After lunch: 1 espresso coffee with 1 packet of sugar

During afternoon:1 orange
Dinner: 7:30 p.m.
Identical to lunch
Between dinner and bedtime: 2 oatmeal biscuits
Water consumed: about 2 L per day

Environment, behavior and social:

Sedentary and without will power to initiate physical activity. She has the habit of going out for dinner two to three times a week and, according with her opinion, she usually eats a lot, feeling badly (heartburn) during the night and having difficulty sleeping. She has difficulty eating every three hours because of her work. She has the habit of drinking coffee after meals and in the morning. She does not notice which foods cause her heartburn.

Colesterol LDL: 90 mg / dL (até 130)
Triglicerídeos: 47 mg / dL (até 150)
Alanina aminotransferase: 48 U / L (até 45)
Aspartato Aminotransferase: 43 U / L (até 32)
Gama Glutamiltransferase: 15 U / L (até 42)
Ferro: 113 µg / dL (60-170)

Endocrinologia

Função da tiróide:
T4 livre: 0,9 ng / dL (0,7-1,8)
TSH: 2,3 mUI / L (0,4-4,2)

Anemia

Ferritina: 56,6 µg / L (50,0-200,0)
Ácido fólico: 14,4 µg / L (> 4.5)
Vitamina B12: 639 ng / L (> 200)

Avaliação clínica:

Medicação (sintomática):
Antiácido Maalox

Trânsito intestinal: regular

Hábitos alimentares:
Acordar: 7:00
Pequeno-almoço: chá preto e torradas com mel e nozes
Durante a manhã: 1 café expresso com 1 pacote de açúcar
Almoço: 12:30
Prato: Meio prato de arroz branco ou massa ou 2 batatas + carne ou peixe (140 g) + legumes cozidos (30g)
Bebe vinho tinto (250 ml)
Após o almoço: 1 café expresso com 1 pacote de açúcar

Durante a tarde: 1 laranja
Jantar: 19:30
Idêntico ao almoço
Entre o jantar e a hora de dormir: 2 biscoitos de aveia
Água consumida: cerca de 2 L por dia

Ambiente, comportamento e social:

Sedentário e sem força de vontade para iniciar a actividade física. Ela tem o hábito de sair para jantar duas a três vezes por semana e, de acordo com a sua opinião, geralmente come muito, sentindo-se mal (azia) durante a noite e tem dificuldade em dormir. Ela tem dificuldade em comer a cada três horas por causa do trabalho. Ela tem o hábito de tomar café após as refeições e pela manhã. Ela não percebe quais os alimentos que lhe causam azia.

Questions:
1. What is gastroesophageal reflux?
2. What care to take
3. What foods should be avoided?
4. What are the main symptoms?
5. What are the associated complications?
6. How serious is gastroesophageal reflux?

Answers:
1. Gastroesophageal reflux can be defined as symptoms or complications resulting from the reflux of gastric contents into the esophagus or beyond, into the oral cavity (including larynx) or lung (1). It is caused by the malfunctioning of a kind of valve, specifically, the lower esophageal sphincter (LES), which opens for food to pass from the esophagus to the stomach and then closes to retain what has been ingested as well as gastric juices (2).
2. Eat at the latest three hours following the last meal; Reduce the volume of food especially at night; Reduce the number of coffees; Avoid black tea and alcohol. Decrease the consumption of beverages during the meal. Wait for at least half an hour before going to bed. The pressure on the stomach caused by excess weight also facilitates the onset of reflux (1,2). These dietary changes are intended to help reduce the need for medication.
The antacid Maalox side effects that may occur in case of prolonged use or at high doses are the phosphorus depletion. If the patient presents chronic renal failure there is a risk of encephalopathy due to aluminum and intoxication by magnesium (3,4).
3. Avoid black tea and alcohol, chocolate, and acidic foods such as broccoli, cucumber, tomato, and spicy foods. The number of coffees should be reduced (2,5).
4. Cough, heartburn, acid regurgitation, and dysphagia (1,5,6).
5. Erosive esophagitis, stricture, Barrett's esophagus, hiatal hernia, and extraesophageal symptoms (7,8,9).
6. The lack of prevention can lead to the exacerbation of symptoms with the origination of other complications. One factor that exacerbates the symptoms is weight gain and having a high body mass index (BMI) (2,7,8).

Questões:
1. O que é refluxo gastroesofágico?
2. Que cuidados tomar?
3. Quais os alimentos que devem ser evitados?
4. Quais são os principais sintomas?
5. Quais são as complicações associadas?
6. Qual a gravidade do refluxo gastroesofágico?

Respostas:
1. O refluxo gastroesofágico pode ser definido como sintomas ou complicações resultantes do refluxo do conteúdo gástrico no esófago ou mais além, na cavidade oral (incluindo laringe) ou pulmão (1). É causado pelo mau funcionamento de uma espécie de válvula, chamada esfíncter esofágico inferior (eei): abre a passagem do alimento do esôfago para o estômago e depois fecha para reter o que foi ingerido e também os sucos gástricos (2).
2. Comer o mais tardar três horas após a última refeição; Reduzir o volume de alimentos, especialmente à noite; Reduzir o número de cafés; Evitar chá preto e álcool. Diminuir o consumo de bebidas durante a refeição. Aguardar algum tempo antes de ir para a cama, de pelo menos meia hora. A pressão no estômago causada pelo excesso de peso também facilita o aparecimento do refluxo (1,2). Estas mudanças na dieta visam ajudar a reduzir a necessidade de medicação.
Os efeitos secundários do antiácido Maalox que podem ocorrer em caso de uso prolongado ou em altas doses são a depleção fosforada. Se o paciente apresentar insuficiência renal crónica, existe o risco de encefalopatia devido ao alumínio e de intoxicação pelo magnésio (3,4).
3. Evitar chá preto e álcool, chocolate, alimentos ácidos como brócolos, pepino, tomate, alimentos condimentados e reduzir o número de cafés (2,5).
4. Tosse, azia, regurgitação ácida e disfagia (1,5,6).
5. Esofagite erosiva, estenose, esófago de Barrett, hérnia hiatal e sintomas extraesofágicos (7,8,9).
6. A falta de prevenção pode levar à exacerbação dos sintomas com a origem de outras complicações. Um factor que agrava os sintomas é o ganho de peso e o elevado índice de massa corporal (IMC) (2,7,8).

References / Referências

1. Roark, R., Sydor, M., Chatila, A. T., Umar, S., De La Guerra, R., Bilal, M., & Guturu, P. (2019). Management of gastroesophageal reflux disease. Disease-a-Month, In Press.
2. Ness-Jensen, E., Hveem, K., El-Serag, H., & Lagergren, J. (2016). Lifestyle intervention in gastroesophageal reflux disease. Clinical gastroenterology and hepatology, 14(2), 175-182.
3. Van Zyl, M. (2011). The effects of drugs on nutrition. South African Journal of Clinical Nutrition, 24(3), S38-S41.
4. Onyango, T. O., Mburu, D. N., Ngugi, M. P., Kamau, J. K., & Juma, K. K. (2017). Effects of Maalox Plus® Antacid and PureCal® Calcium Supplements on Haematological and Biochemical Parameters of Rats Subjected to Alcohol Intoxication. Journal of Alcoholism & Drug Dependence, 5(265), 2.
5. Richter, J. E., & Rubenstein, J. H. (2018). Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology, 154(2), 267-276.
6. Herregods, T. V. K., Bredenoord, A. J., & Smout, A. J. P. M. (2015). Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era. Neurogastroenterology & Motility, 27(9), 1202-1213.
7. Katz, P. O., Gerson, L. B., & Vela, M. F. (2013). Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. The American journal of gastroenterology, 108(3), 308.
8. Moore, M., Afaneh, C., Benhuri, D., Antonacci, C., Abelson, J., & Zarnegar, R. (2016). Gastroesophageal reflux disease: a review of surgical decision making. World journal of gastrointestinal surgery, 8(1), 77.
9. Tan, V. P. Y., Wong, B. C., Wong, W. M., Leung, W. K., Tong, D., Yuen, M. F., & Fass, R. (2016). Gastroesophageal Reflux Disease. Journal of Clinical Gastroenterology, 50(1), e1-e7.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biomedical Sciences | *Ciências Biomédicas* *Biomed Biopharm Res.,* 2020; 17(1): 48-62

doi: 10.19277/bbr.17.1.227

A pilot clinical study to evaluate the effectiveness of olive extract containing hydroxytyrosol for oral and topical treatment of melasma

Estudo clínico piloto para avaliar a eficácia do extrato de oliva contendo hidroxitirosol para tratamento oral e tópico do melasma

Julia de Toledo Bagatin [1], Ediléia Bagatin [2], Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos [1]*

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Avenida do Café, S/N, Ribeirão Preto – SP, 14040-903; [2]Dermatology Department – Medical School – Federal University of São Paulo, R. Borges Lagoa, 508 - Vila Clementino, São Paulo - SP, 04038-001

*Corresponding author: pmcampos@usp.br

Abstract

Melasma is a common hyperpigmentation that can cause impairment of quality of life. Current melasma treatments present limitations and adjuvant treatments are of great interest.. The objective of this study was to evaluate the clinical efficacy of an oral and topical treatment based on olive extract containing hydroxytyrosol for melasma control. A pilot clinical study was conducted with 42 women with melasma, randomized in three groups of 14 participants - control, oral or topical, who received daily treatment containing hydroxytyrosol or placebo for 90 days. Melasma was evaluated once a month using the melasma area and severity index (mMASI) and the melanin and erythema index. Statistical analysis was performed using ANOVA between the groups and paired ANOVA (RM) in each group individually. The melanin index and mMASI resulted in reduced values for oral treatment, compared to the control and topical group with no significant difference ($p > 0.05$). However, oral treatment evaluated paired by time showed a significant reduction in mMASI ($p < 0.0001$) and melanin index ($p = 0.0466$) after 60 days. Finally, the treatments with olive extract based on hydroxytyrosol showed great potential for the control of melasma or as an adjunctive to traditional dermatological treatment.

Keywords: Hydroxytyrosol, olive extracts, depigmentation agents, clinical trial, melasma

Resumo

O melasma é uma das hiperpigmentações adquiridas mais comuns e pode causar prejuízos na qualidade de vida. Os tratamentos apresentam limitações e, portanto, tratamentos auxiliares para o controle do melasma são de grande interesse. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia clínica de tratamentos oral e tópico à base de extrato de oliva contendo hidroxitirosol para o controle do melasma. Foi realizado um estudo clínico piloto com 42 mulheres com melasma randomizadas em três grupos com 14 participantes - controle, oral ou tópico - que receberam tratamento diário com hidroxitirosol ou placebo por 90 dias. O melasma foi avaliado mensalmente utilizando os índices de área e gravidade do melasma (mMASI) e de melanina e eritema. A análise estatística foi realizada usando ANOVA entre os grupos e ANOVA RM em cada grupo individualmente. O índice de melanina e eritema e mMASI resultaram em valores menores para o tratamento oral comparado com os grupos controle e tópico. No entanto, o tratamento oral reduziu significativamente os valores do índice mMASI ($p=0,0132$) e melanina ($p=0.047$) após 60 dias. Por fim, os tratamentos com extrato de oliva baseado em hidroxitirosol mostraram grande potencial para o controle do melasma ou como adjuvante ao tratamento convencional.

Palavras-chave: Hidroxitirosol, extrato de oliva, agentes despigmentantes, estudo clínico, melasma

Received / *Recebido*: 27/10/2019
Accepted / *Aceite*: 09/04/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Melasma is a common acquired chronic hyperpigmentation affecting mostly the face, characterized by brown patches of variable darkness. Melasma affects all racial types with variable incidence but is more common in women of skin phototypes III to V and residing in areas with high ultraviolet radiation incidence (1,2) The exact cause of melasma is still unknown but it is considered to have a heterogeneous pathology involving multiple factors. Exposure to sunlight, family history, and hormonal alterations are the main triggering factors (3).

Although it is an aesthetical asymptomatic disorder, melasma can cause significant psychosocial discomfort, impairing quality of life and leading to high therapeutic demand (4).

Diverse treatment options are available, including topical and oral agents, chemical peelings and laser administration. Therapy remains a challenge, however, as results are highly variable, unpredictable, inconsistent, and associated with frequent relapses and adverse effects (5). Topical treatment is still the main modality of treatment for hyperpigmentation conditions, including melasma.

Despite the multifactorial mechanism involved in the development of melasma, inhibition of melanogenesis by topical treatment is the main target of depigmenting agents. The standard depigmenting agent is hydroquinone, but its safety is controversial due to cases of exogenous ochronosis and other adverse events (6). Therefore, alternative tyrosinase inhibitors representing safer and more effective depigmenting agents for melasma are of great demand (7,8).

Tyrosinase is an enzyme that catalyze the first two main steps of melanin biosynthesis, which L-tyrosine is hydroxylated to L- dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and sequentially oxidated to dopaquinone (8, 9).

Dihydroxyphenols, such as hydroquinone and hydroxytyrosol, represents a known group of antioxidant molecules that inhibit tyrosinase as competitive substrates L- DOPA, generating enzymatic reaction products that do not undergo the next steps of melanogenesis (8,10). However, hydroxytyrosol has the advantage to be considered non-cytotoxic and non-mutagenic according to experiments in animal models (11).

Hydroxytyrosol (3,4-dihydroxiphenylethanol) is the main antioxidant phenol found in olive extracts. In vitro studies have demonstrated it has diverse pharmacological effects (antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and neuro-protective (12)) and could also be beneficial to the adjunctive treatment of melasma. Hydroxytyrosol is a very potent antioxidant, with higher antioxi-

Introdução

Melasma é uma hiperpigmentação crônica adquirida comum que afeta principalmente a face, caracterizada por manchas marrons de escuridão variável. Melasma afeta todos os tipos raciais com incidência variável, mas é mais comum em mulheres, fototipos III a V e residentes em áreas com alta incidência de radiação ultravioleta (1,2). A causa exata do melasma ainda é desconhecida, mas é considerada uma patologia heterogênea por envolver múltiplos fatores. A exposição ao sol, o histórico familiar e as alterações hormonais são os principais fatores desencadeantes (3).

Embora seja um distúrbio estético assintomático, o melasma pode causar desconforto psicossocial significativo, prejudicando a qualidade de vida e levando à alta demanda terapêutica (4).

Diversas opções de tratamento estão disponíveis, incluindo agentes tópicos e orais, peelings químicos e laser. Mas a terapia continua a ser um desafio, pois os resultados são altamente variáveis, imprevisíveis e inconsistentes, associados a frequentes recaídas e efeitos adversos (5). O tratamento tópico ainda é a principal modalidade de tratamento para condições hiperpigmentares, incluindo o melasma.

Apesar do mecanismo multifatorial envolvido no desenvolvimento do melasma, a inibição da melanogênese pelo tratamento tópico é o principal alvo dos agentes despigmentantes. O agente despigmentante padrão é a hidroquinona, mas sua segurança é controversa devido a casos de ocronose exógena e outros eventos adversos (6). A hidroquinona atua como um inibidor da tirosinase; no entanto, inibidores da tirosinase mais seguros e eficazes para atuar como agentes despigmentantes do melasma são de grande demanda (7,8).

A tirosinase é uma enzima que catalisa os dois primeiros passos principais da biossíntese da melanina, cuja L-tirosina é hidroxilada em L-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) e sequencialmente oxidada em dopaquinona (8,9).

Os diidroxifenóis, como hidroquinona e hidroxitirosol, representam um conhecido grupo de moléculas antioxidantes que inibem a tirosinase como substratos competitivos à L-DOPA, gerando produtos de reações enzimáticas que não passam pelos próximos passos da melanogênese (8,10). Além disso, o hidroxitirosol tem a vantagem de ser considerado não citotóxico ou mutagênico por experimentos em modelos animais (11).

O hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) é o principal fenol antioxidante encontrado nos extratos de oliva. Estudos in vitro demonstraram diversos efeitos farmacológicos como atividade antioxidante, antiin-

dant activity than ascorbic acid (13), a well-known but unstable ingredient for melasma treatment that exerts its depigmenting action by strong antioxidant activity (14). Another in vitro study with hydroxytyrosol reported that the dose-dependent inhibition of tyrosinase was comparable to another depigmenting agent, kojic acid (21). In fact, hydroxytyrosol has a potent radical scavenging activity and can protect UV-derived oxidative stress cytotoxicity to keratinocytes (22, 22,24).

In addition, in vitro studies have shown that hydroxytyrosol has an anti-inflammatory potential to inhibit matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene expression (16). This is one of the metalloproteins responsible for basal membrane impairment in a microenvironment of cutaneous photoaging (18), an attribute of melasma's pathology (5,6).

In this context, olive extracts containing hydroxytyrosol presents potential pharmacological effects as a safe botanical dermatological alternative in topical and oral treatment for melasma control or as an adjunctive long-term maintenance treatment.

The aim of the study was to evaluate the clinical efficacy of an oral and topical treatment based on olive extract containing hydroxytyrosol for melasma control.

Material and Methods

A randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study was conducted with a convenience sample of 42 women for 90 days at the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Ribeirao Preto - SP, Brazil. The study protocol was previously approved by the institutional Ethical Commission for Research (CEP/FCFRP nº4346115.0.00005403). The study was performed from January 2017 to October 2017. Informed written consent was obtained from all subjects prior to enrollment. Inclusion criteria were being women, age 30-50, Fitzpatrick phototypes III and IV (18), presenting center-facial melasma. Patients were screened by telephone and, if eligible, underwent a screening examination by the investigators at the university. Non-inclusion criteria were pregnancy, history of adverse reaction to cosmetics, systemic diseases, and use of skin-whitening treatments three months prior to inclusion in the study.

At the initial visit, a pre-structured interview was con-

flamatória, supressora tumoral e neuro-protetora (12, 15), e também poderiam ser benéficos ao tratamento adjuvante do melasma. O hidroxitirosol é um antioxidante potente, sua atividade antioxidante é mais efetiva que o ácido ascórbico (13), um ingrediente renomado, mas instável para o tratamento do melasma que exerce sua ação despigmentante pela forte atividade antioxidante (14). Outro estudo in vitro com hidroxitirosol relatou que a inibição da tirosinase é dependente da dose e comparável ao ácido kójico, outro ingrediente ativo usado como agente despigmentante (21). De fato, o hidroxitirosol tem uma atividade de eliminação de radicais livres potente e pode proteger a citotoxicidade gerada pelo estresse oxidativo derivado do UV em queratinócitos (22,23,24).

Além disso, estudos in vitro evidenciaram que o hidroxitirosol tem o potencial anti-inflamatório para inibir a expressão do gene metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (16). Esta é uma das metaloproteínas responsáveis pelo comprometimento da membrana basal em um microambiente do fotoenvelhecimento cutâneo (17), uma característica presente na patologia do melasma (5,6).

Nesse contexto, o extrato de oliva contendo hidroxitirosol apresentam potenciais efeitos farmacológicos como uma alternativa de origem botânica segura para o tratamento tópico e oral no controle do melasma ou como um tratamento de manutenção a longo prazo. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia clínica de um tratamento oral e tópico à base de extrato de oliva contendo hidroxitirosol para o controle do melasma.

Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo clínico piloto randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, com uma amostra de conveniência definida com 42 mulheres durante 90 dias na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Ribeirão Preto - SP, Brasil. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP / FCFRP nº4346115.0.00005403). O estudo foi realizado de janeiro de 2017 a outubro de 2017. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelas participantes antes de sua inscrição. Os critérios de inclusão foram: mulheres, idade 30-50, Fitzpatrick Fototipos III e IV (18) apresentando melasma centro-facial. As pacientes foram selecionadas por telefone e, se elegíveis, foram submetidas a um exame de triagem pelos pesquisadores da universidade. Os critérios de não inclusão foram gravidez, história de reação adversa a cosméticos, doenças sistêmicas, uso de tratamentos

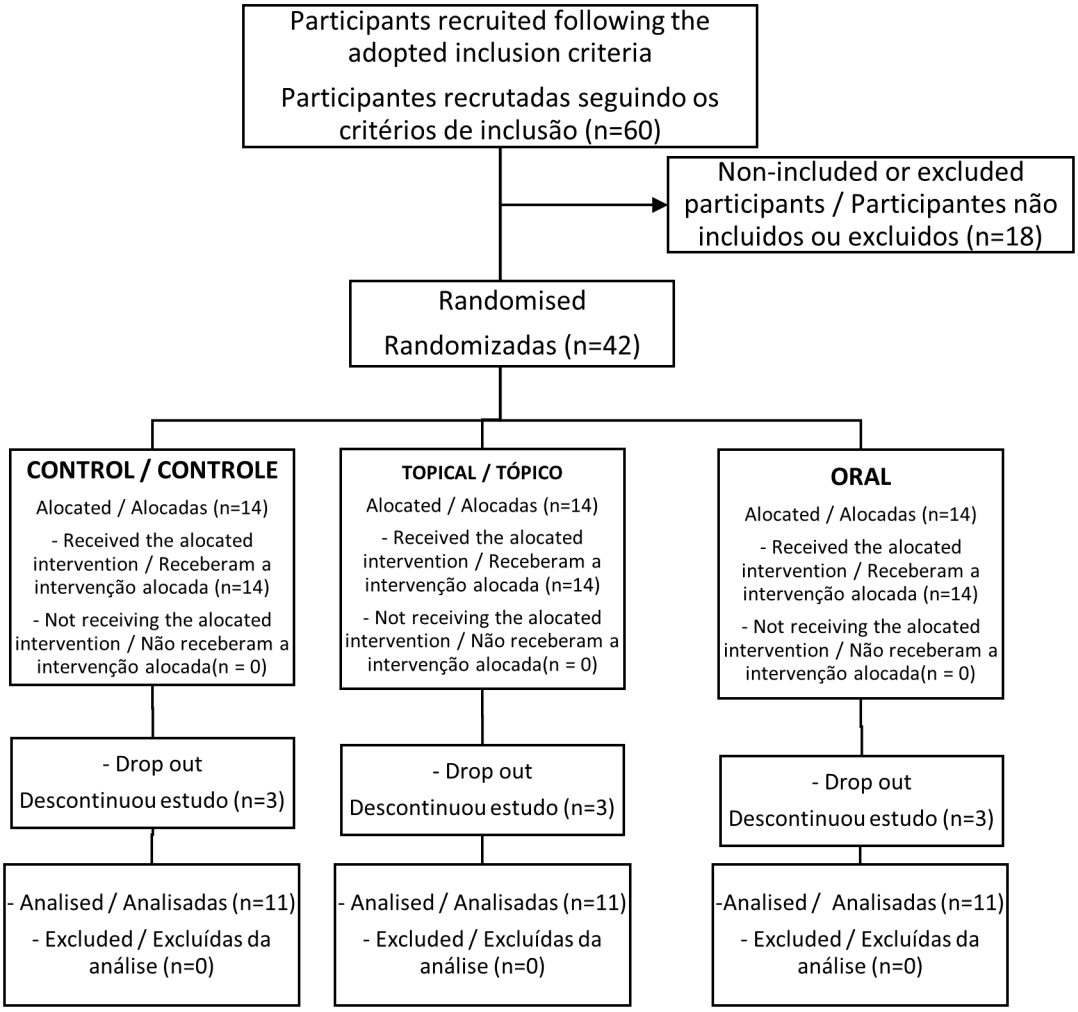


Figure 1 - Flow diagram according to CONSORT guidelines showing the flow of participants in the trial, including dropouts

Figura 1 - Diagrama de fluxo de acordo com as diretrizes do CONSORT mostrando o fluxo de participantes no estudo, incluindo desistências

ducted to obtain personal information about influencing or exacerbating factors, including the time of onset of the melasma, subjective factor associated to its development, history of pregnancy, use of contraceptive pill, sun exposure, drug history, previous treatments for melasma and family history of melasma.

Figure 1 shows the flow diagram according to CONSORT guidelines showing the flow of participants in the study, including dropouts.

A statistic software (19) for randomization assignment in block design divided the subjects in three groups with 14 participants each that received the interventions as described:

de clareamento da pele 3 meses antes da inclusão no estudo.

Na visita inicial, foi realizada uma entrevista pré-estruturada para obter informações pessoais sobre fatores que influenciam ou exacerbam a doença, incluindo o tempo de início do melasma, fator subjetivo associado ao seu desenvolvimento, história de gravidez, uso de pílula anticoncepcional, exposição ao sol, histórico medicamentoso, tratamentos prévios para o melasma e história familiar.

A Figura 1 mostra o diagrama de fluxo de acordo com as diretrizes do CONSORT mostrando o fluxo de participantes no estudo, incluindo desistências.

Um software estatístico (19) para a randomização em blocos dividiu as participantes em três grupos com 14 participantes, que receberam as intervenções descritas a seguir:

▪ Control: topical vehicle formulation and oral placebo
▪ Topical: topical formulation containing the olive extract and oral placebo
▪ Oral: topical vehicle formulation and oral capsule containing the olive extract

The topical formulation was based on an emulsion composed by (INCI - International Nomenclature Cosmetic Ingredient): Water, Carbomer, Caprylic capric triglyceride, Ceteareth – 20, Cetyl Alcohol, C12-C15 Alkyl Benzoate, Butylene Glycol, Glycerin, Dimethicone Cyclopentasiloxane, Phenoxyethanol, Polysorbate 80, Butylated hydroxytoluene, Dissodium EDTA. This topical formulation was added or not (vehicle) with 1% of olive extract, which contains 20% hydroxytyrosol (HydrOlive®, Cobiosa, Spain). Oral supplementation consisted of capsules containing 300 mg of olive extract containing 3% hydroxytyrosol (Oli-Ola®, Nexira Health, France) or placebo.
Participants were advised to use the products and sunscreen daily for 90 days. All participants used the same sunscreen. The study was designed as a double blind study, with neither the investigator nor the patients aware of the treatment content.
Clinical evaluations were performed before treatment (baseline), and 30, 60 and 90 days after the initiation of treatment.
The subjective evaluation of melasma was obtained by modified Melasma Area and Severity Index (mMASI) score (20), based on high resolution images of the face at standard positions and luminosity using Visioface 1000D equipment (Courage-Khazaka Electronic, Köln, Germany). The score was calculated by dividing the face into four areas: forehead (F), right malar (RM), left malar (LM), and chin (C), which correspond to 30%, 30%, 30%, and 10% of the total face area, respectively. The melasma in each area was graded on two variables - area and darkness - that were scored as follows: area of involvement: 0 = absent, 1 = up to 10%, 2 = 10%-29%, 3 = 30%-49%, 4 = 50%-69%, 5 = 70%-89%, and 6 = 90%-100%; darkness: 0 = absent, 1 = slight, 2 = mild, 3 = marked, and 4 = severe. The total score was calculated (mMASI=0.3A (f) P (f)+ 0.3A (md) P (md)+ 0.3A (me) P (me)+ 0.1A (q) P (q)) and ranged from 0 to 24.
The skin pigmentation evaluation was obtained through a narrow band reflectance spectrophotometer Mexameter (Courage-Khazaka Electronic, Köln, Germany), which provided objective measurements from the lesional region of melanin and hemoglobin (erythema) indexes.
The experimental continuous data obtained in mMASI and Mexameter readings were evaluated using analysis

▪ Controle: formulação tópica de veículo e placebo oral.
▪ Tópica: formulação tópica contendo o extrato de oliva e placebo oral.
▪ Oral: formulação tópica de veículo e oral contendo o extrato de oliva.
A formulação tópica foi uma emulsão à base de (INCI - International Nomenclature Cosmetic Ingredient): Water, Carbomer, Caprylic capric triglyceride, Ceteareth – 20, Cetyl Alcohol, C12-C15 Alkyl Benzoate, Butylene Glycol, Glycerin, Dimethicone, Cyclopentasiloxane, Phenoxyethanol, Polysorbate 80, Butylated hydroxytoluene, Dissodium EDTA, acrescida ou não (veículo) de 1% de extrato de oliva, contendo 20% hidroxitirosol (HydrOlive®, Cobiosa, Espanha). A suplementação oral foi feita com cápsulas contendo 300 mg de extrato de oliva contendo 3% de hidroxitirosol, Oli-Ola®, Nexira Health, França, ou placebo. As participantes do estudo foram orientadas a utilizar os produtos e o protetor solar diariamente por um período de 90 dias. Todas as participantes usaram o mesmo protetor solar. Nem o investigador nem os pacientes estavam cientes do conteúdo dos tratamentos - estudo duplo cego.
As avaliações clínicas foram realizadas antes - valores basais e após o período de 30, 60 e 90 dias de tratamento.
A avaliação do melasma foi realizada por meio do escore modificado Melasma Area and Severity Index (mMASI) (20), baseado em imagens de alta resolução da face em posições e luminosidade padronizados pelo equipamento Visioface 1000D (Courage-Khazaka Electronic, Köln, Alemanha). A pontuação foi calculada dividindo a face em quatro áreas: testa (F), malar direito (MD), malar esquerdo (ME) e queixo (Q), que correspondem a 30%, 30%, 30% e 10% da área total da face, respectivamente. O melasma em cada área foi classificado em duas variáveis - área e escuridão, que foram classificadas da seguinte forma: área de envolvimento: 0 = ausente, 1 = até 10%, 2 = 10% -29%, 3 = 30% -49 %, 4 = 50% -69%, 5 = 70% -89% e 6 = 90% -100%; Escuridão: 0 = ausente, 1 = leve, 2 = leve, 3 = marcado e 4 = grave. O escore total foi calculado (mMASI = 0,3A (f) P (f) + 0,3A (md) P (md) + 0,3A (me) P (me) + 0,1A (q) P (q)) e varia de 0 a 24.
A avaliação da pele por medidas objetivas de pigmentação na região lesionada foram determinadas com um espectrofotômetro de refletância de banda estreita Mexameter (Courage-Khazaka Electronic, Köln, Alemanha) fornecendo o índice de melanina e hemoglobina (eritema).
Os dados experimentais contínuos obtidos nas leituras de mMASI e Mexameter foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), uma vez que os dados foram distribuídos normalmente pelo teste de normali-

of variance (ANOVA), as the data was found to be normally distributed by the Shappiro-Wilk normality test (mMASI p=0.182; Mexameter p=0.110). A p value <0.05 was assumed to indicate statistical significance for the comparison of the groups at four times: basal (t0), 30 (t30), 60 (t60) and 90 days (t90). Also, ANOVA with repeated measures (RM) was used to evaluate each treatment as single-arm to observe significative improvement comparing baseline values to 90 days. The statistical data was analyzed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, California, USA), alpha set at 0.05.

Results

After evaluating 60 participants screened by telephone, 42 met the inclusion criteria and were randomized into the four treatment groups with 14 allocated to each one: control, topical and oral. Three subjects in each studied group dropped out without any specific reason. The data from these patients were not considered in the objective efficacy analysis.

The baseline characteristics of the participants are summarized in Table 1. The age of the participants ranged from 32 to 49 years, with a mean of 40.5 ± 4.3 years. Overall, 29 (69%) participants had Fitzpatrick phototype III and 13 (31%) phototype IV. Moreover, the informed duration of melasma was distributed as follows: 17 (40%) more than 10 years, 11 (26%) from 6 to 10 years, 11 (26%) for up to 5 years, 3 (8%) no information, and, none (0%) for less than 1 year.

Furthermore, the triggering factors associated with the development of melasma in participant's opinions (n=42) were as follows: 17 (40%) pregnancy, 5 (12%) hormonal therapy, 8 (19%) solar radiation, 3 (8%) psychologic distress, 1 (2%) cosmetic use, and 8 (19%) reported no association to any specific cause. Pregnancy occurred in 34 (80%) of cases, and gestation associated melasma was reported by 17 (50%) of these patients. Thirty five (83%) had used oral contraceptives, and 30 (71%) had previously tried dermatological treatment.

Results obtained for facial pigmentation evaluated by mMASI were considered normal by the Shappiro-Wilk tests for treatment and time variables (p>0.05). The mMASI presented great intervariability between groups as a result of intrinsic melasma characteristics. The facial pigmentation evaluated by mMASI showed no significant differences at the beginning of the study, as well as in its sequence at 30, 60 and 90 days (p> 0.05, in each time evaluated). In contrast, significant results

dade de Shappiro-Wilk (mMASI p=0,182; Mexameter p=0,110). Em seguida, considerou-se um valor de P <0,05 para indicar significância estatística para a comparação dos grupos em quatro momentos: basal (t0), 30 (t30), 60 (t60) e 90 dias (t90). Além disso, ANOVA com medidas repetidas (RM) foi usado para avaliar cada tratamento como braço único para observar uma melhora significativa de cada tratamento individualmente comparando os valores basais aos 90 dias. Os dados estatísticos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software - Califórnia, EUA), alfa a 0,05.

Resultados

Após avaliação de 60 participantes selecionadas por telefone, 42 preencheram os critérios de inclusão e foram randomizadas para os quatro grupos de tratamento com 14 alocadas para cada um: controle, tópico e oral. Três participantes em cada grupo estudado desistiram sem qualquer razão específica. Os dados desses pacientes não foram considerados na análise objetiva da eficácia. As características basais dos participantes estão resumidas na Tabela 1. A idade dos participantes variou de 32 a 49 anos, com média de 40,5 ± 4,3 anos. No geral, 29 (69%) participantes apresentaram o fototipo III de Fitzpatrick e 13 (31%) o fototipo IV. A duração informada do melasma foi: 17 (40%) mais de 10 anos, 11 (26%) de 6 a 10 anos, 11 (26%) até 5 anos, 3 (8%) sem informação e, nenhuma por menos de 1 ano.

Além disso, os fatores desencadeantes associados ao desenvolvimento do melasma na opinião das participantes (n = 42) foram: 17 (40%) gestação, 5 (12%) terapia hormonal, 8 (19%) radiação solar, 3 (8%) psicológica angústia, 1 (2%) uso cosmético e 8 (19%) relataram nenhuma associação a qualquer causa específica. Gravidez havia ocorrido em 34 (80%) dos casos, e o melasma associado à gestação foi relatado por 17 (50%) dessas pacientes. Trinta e cinco (83%) haviam usado contraceptivos orais e 30 (71%) haviam realizado tratamento dermatológico anteriormente.

Os resultados obtidos para a pigmentação facial avaliada pelo mMASI foram consideradas normais pelos testes de Shappiro-Wilk nas variáveis tratamento e tempo (p>0,05). O mMASI apresentou grande intervariabilidade entre os grupos em decorrência das características intrínsecas do melasma. Os valores de pigmentação facial avaliados pelo mMASI não apresentaram diferenças significativas no início do estudo, assim como em sua sequência, aos 30, 60 e 90 dias (ANOVA p > 0,05, em cada tempo avaliado).

Table 1 - Baseline characteristics of patients and melasma (SD standard deviation)
Tabela 1 - Características basais das participantes e do melasma por grupo (DP desvio padrão)

Groups **Grupos**	**Control** **Controle** **(n=14)**	**Topical** **Tópico** **(n=14)**	**Oral** **(n=14)**
Age (years), mean ± SD **Idade (anos), média ± DP**	39.1 ± 4.6	40.5 ± 4.1	41.9 ± 4.0
Phototype, Fototipo, n (%)			
III	9 (64%)	9 (64%)	11 (78%)
IV	5 (36%)	5 (36%)	3 (22%)
Melasma Duration / Duração do melasma, n (%)			
Up to 5 years / Até 5 anos	2 (14%)	3 (21%)	5 (36%)
6 to 10 years / 6 a 10 anos	5 (36%)	4 (29%)	2 (14%)
More than 10 years / Mais de 10 anos	4 (29%)	7 (50%)	6 (43%)
Not informed / Não informado	3 (21%)	0	1 (7%)
Previous dermatological treatment **Tratamento dermatologico prévio, n (%)**	11 (78%)	7 (50%)	12 (85%)
mMASI, mean±SD / média ± DP	8.64 ± 3.9	8.41 ± 3.5	8.54 ± 4.0
Melanin / Melanina index **mean ± SD / média ± DP**	539.5 ± 40.9	539.5 ± 32.8	532.3 ± 31.5
Erythema / Eritema index **mean ± SD / média ± DP**	642.8 ± 22.8	648.1 ± 24.4	659.4 ± 25.3

were detected in the mMASI when the treatments were analyzed as a single-arm with paired values for the time variation (ANOVA RM, p <0.0001), and by multiple comparisons, with Bonferroni correction, we verified this result refers to the oral group comparing baseline time to 60 (p = 0.0212) and 90 days (p = 0.0008), and to the topical group, which also showed improvement comparing the baseline time with 90 days (p = 0.0003). Nevertheless, a decrease of the score was observed for all groups during the treatment, especially for oral therapy, which presented a 22% decrease, compared to 11% for control group, and 15% for topical treatment (Figure 2).

Figures 3, 4 and 5 show high resolution images from the study participants as examples as illustration of results before and after treatments.

After confirming the normal distribution of data obtained for time and treatments (Shappiro-Wilk, p> 0.05), the melanin index measured by the Mexameter showed a slight decrease in pigmentation in the oral group. Even so, the results of the melanin index did not show significant reduction between the groups at all evaluated times (ANOVA, p > 0.05), as was observed

Por outro lado, resultados significativos foram detectados no mMASI quando os tratamentos foram analisados individualmente com valores pareados para a variação de tempo (ANOVA RM, p < 0,0001), e pelas comparações múltiplas, com correção de Bonferroni, verificamos que este resultado se refere ao grupo oral na comparação entre o tempo inicial comparado a 60 (p=0,0212) e 90 dias (p=0,0008), e ao grupo tópico, que também apresentou melhora comparando o tempo basal com o de 90 dias (p=0,0003). No entanto, observou-se diminuição do escore em todos os grupos durante o tratamento, especialmente para o tratamento oral, que apresentou redução de 22%, comparado a 11% no grupo controle e 15% no tratamento tópico (Figure 2).

As Figuras 3, 4 e 5 ilustram as imagens de alta resolução obtidas de participantes do estudo, antes e após os tratamentos.

Após verificar a distribuição normal dos dados obtidos para tempo e tratamentos (Shappiro-Wilk, p>0,05), o índice de melanina medido pelo aparelho Mexameter apresentou leve diminuição da pigmentação no grupo oral. Mesmo assim, os resultados dos índices de melanina não apresentaram redução significativas entre os grupos

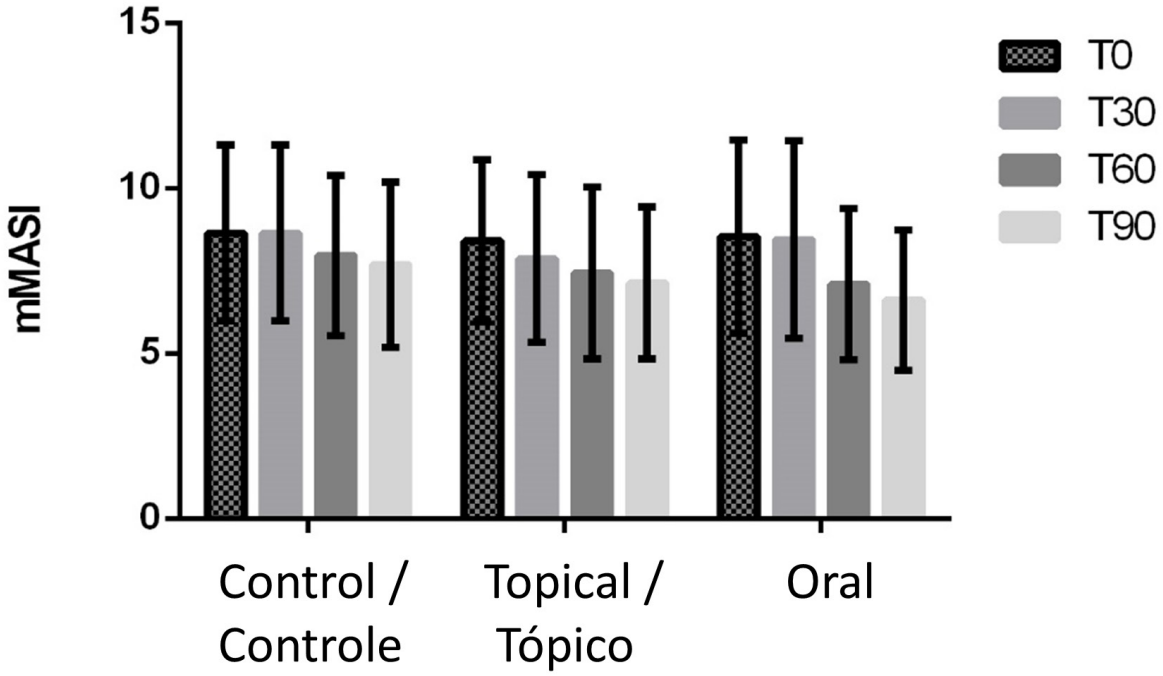


Figure 2 - mMASI values among treatment groups at evaluated times (means and confidence intervals CI95% are indicated)

Figura 2 -Valores do mMASI entre os grupos de tratamento nos tempos avaliados (são mostrados médias e intervalos de confiança IC95%)

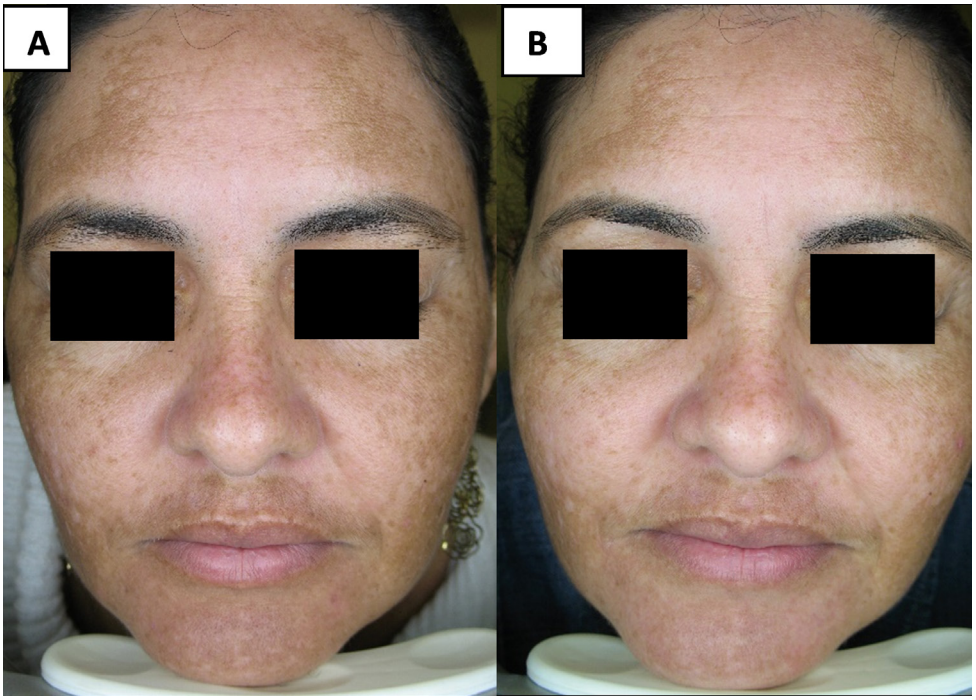


Figure 3 - A 41 year-old woman with recalcitrant melasma for 8 years before treatment (A) and after (B) 60 days of use of the topical treatment containing the olive extract

Figura 3 - Participante de 41 anos com melasma recalcitrante há 8 anos antes do tratamento (A) e após (B) 60 dias de uso do tratamento tópico contendo o extrato de oliva

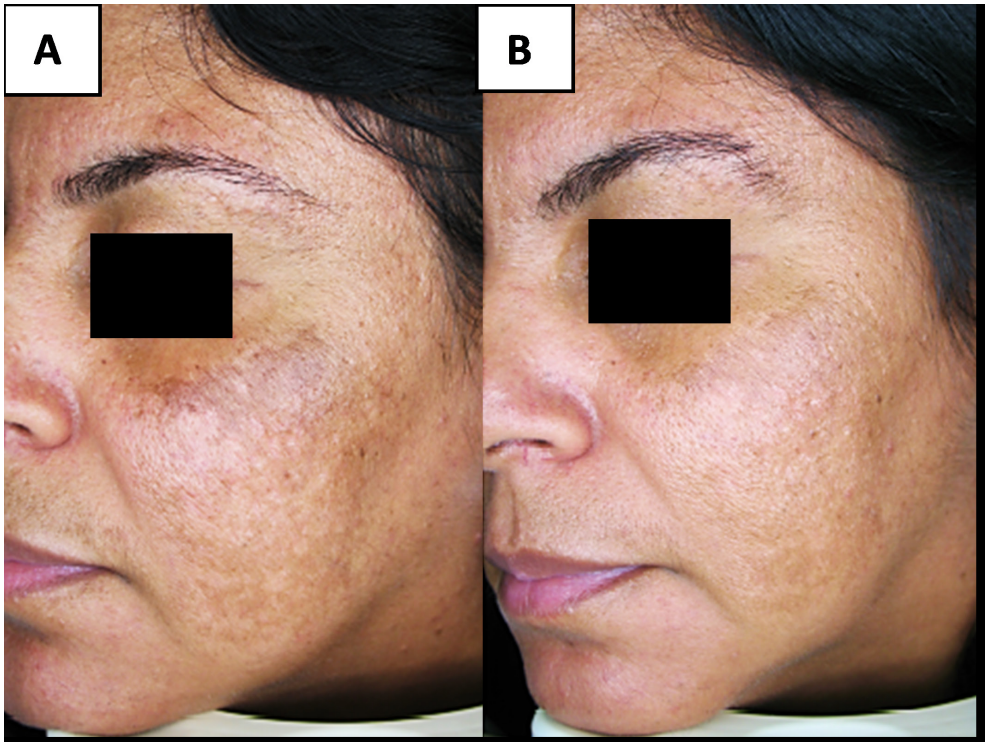


Figure 4 - A 36-year old woman with recalcitrant melasma for 19 years before treatment (A) and after (B) 60 days of use of the oral treatment containing the olive extract

Figura 4 - Participante de 36 anos com melasma recalcitrante há 19 anos antes do tratamento (A) e após (B) 60 dias de uso do tratamento oral contendo o extrato de oliva

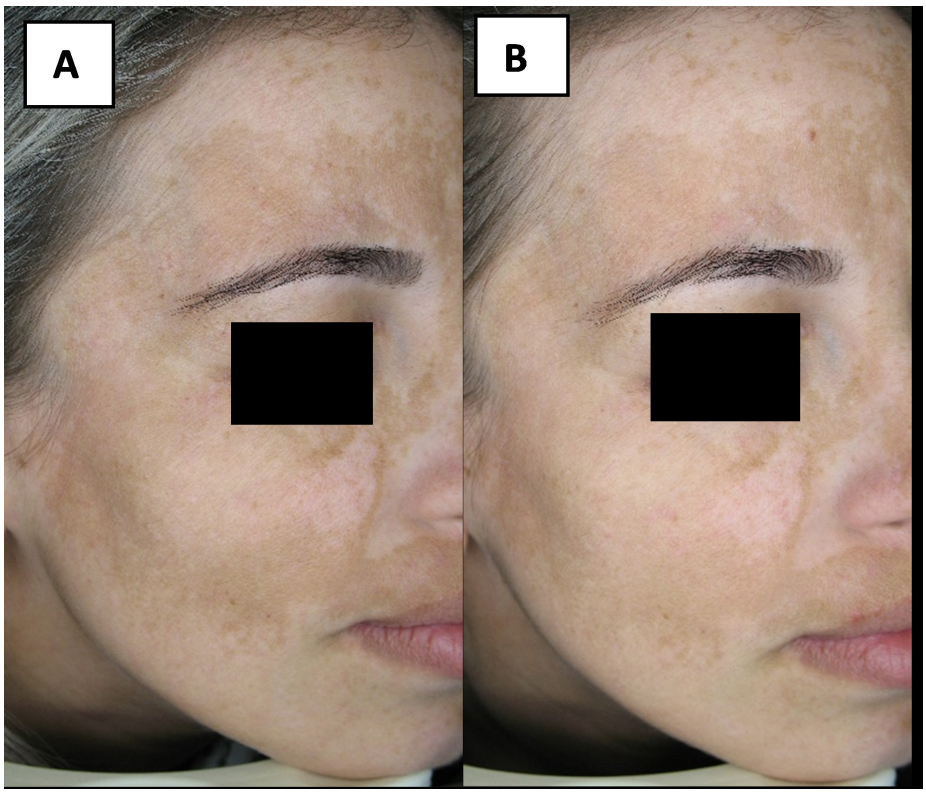


Figure 5 - A 38 year-old woman with recalcitrant melasma for 2 years before treatment (A) and after (B) 60 days of placebo use

Figura 5 - Participante de 38 anos com melasma recalcitrante por 2 anos antes do tratamento (A) e após (B) 60 dias de uso de placebo

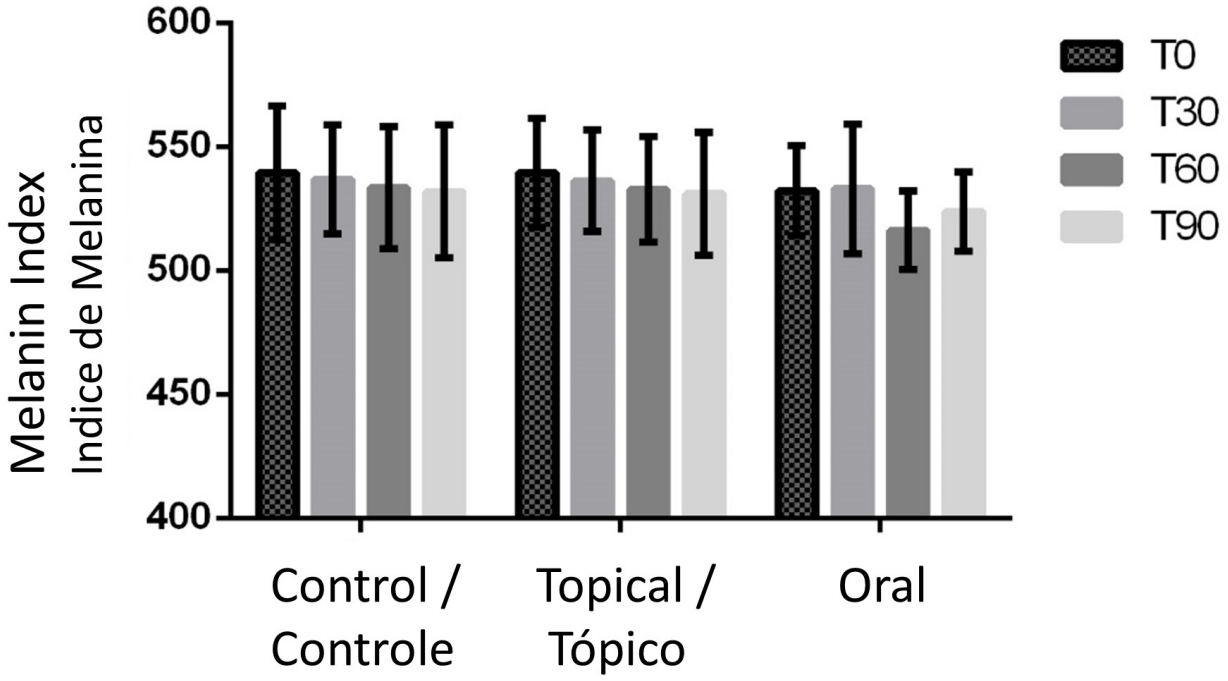


Figure 6 - Melanin index among treatment groups at evaluated times (means and confidence intervals CI95% are indicated)

Figura 6 - Índice de melanina entre os grupos de tratamento nos tempos avaliados (são mostrados médias e intervalos de confiança IC95%)

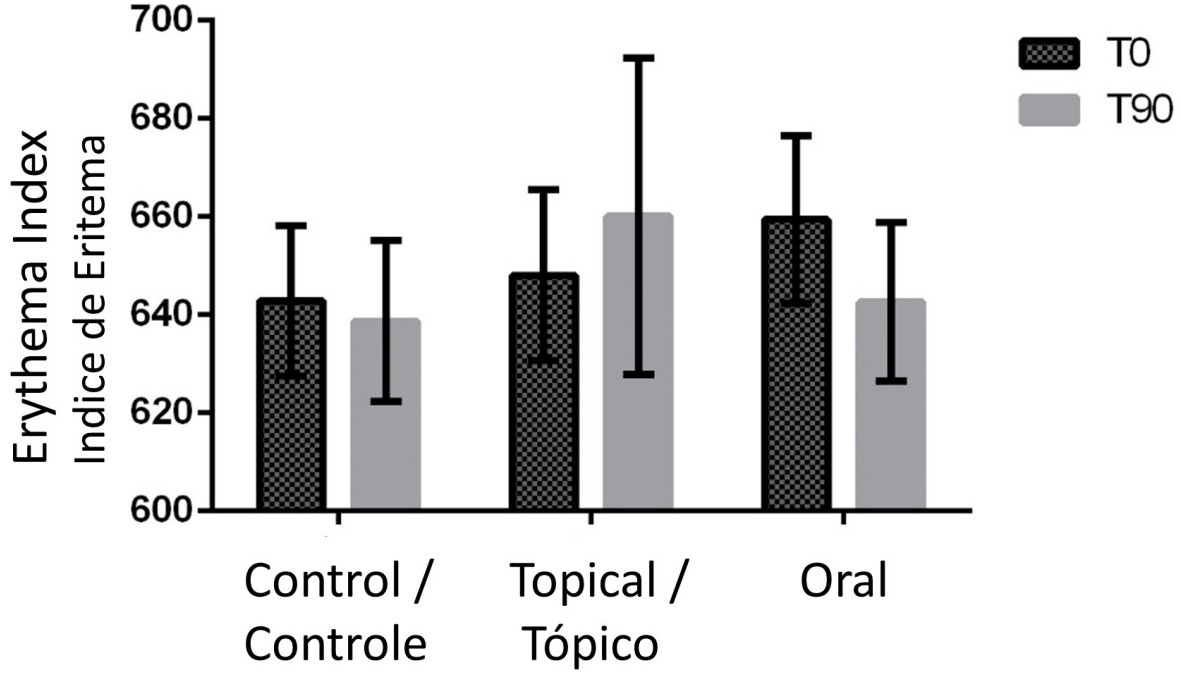


Figure 7 - Erythema index among treatment groups at evaluated times (means and confidence intervals CI95% are indicated)

Figura 7 - Índice de eritema entre os grupos de tratamento nos tempos avaliados (são mostrados médias e intervalos de confiança IC95%)

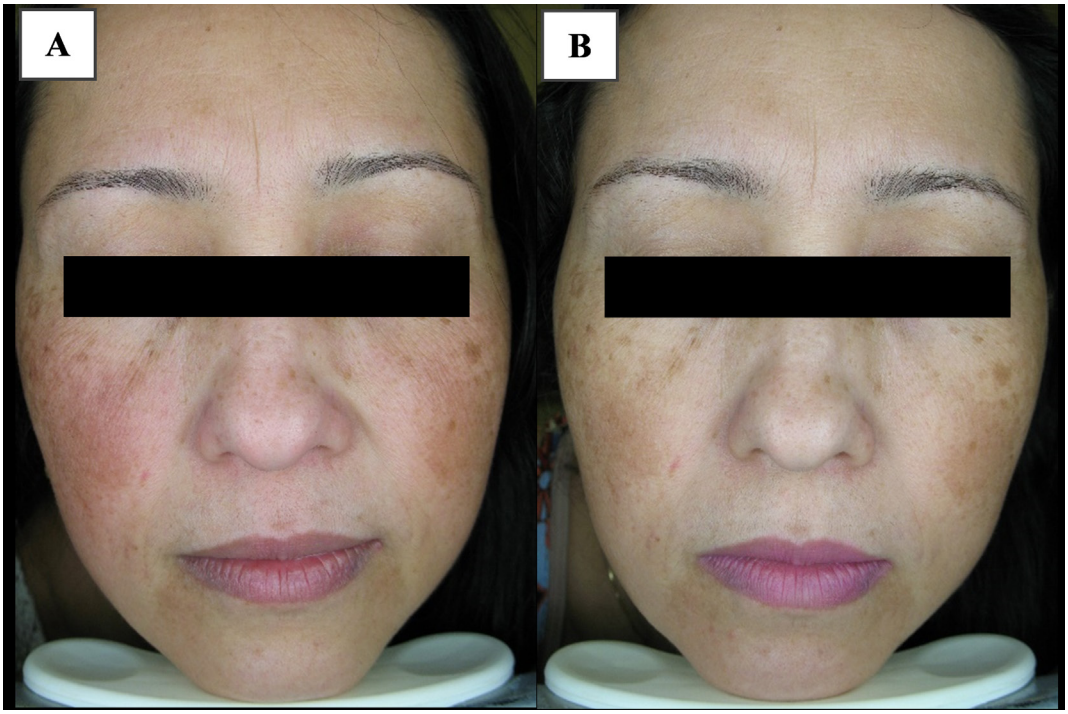


Figure 8 - A 36 year-old woman with erythema before treatment (A) and after 60 days (B) of the oral treatment containing the olive extract
Figura 8 - Participante de 36 anos com eritema antes (A) e após 60 dias (B) do tratamento oral contendo o extrato de oliva

in mMASI (Figure 6). However, significant results were detected in the melanin index when paired values for time variation in the oral group were analyzed individually as a single-arm (ANOVA RM, p = 0.0466) comparing the initial time with 60 days (p = 0.0167) in multiple comparisons.

The Mexameter also provides erythema quantification related to vascular feature of melasma. The baseline values had no significant differences (ANOVA, p=0.277). Despite no significant difference between the treatments after 90 days (ANOVA, p=0.290), the oral group showed higher decrease in erythema compared to the other groups (Figure 7). Figure 8 shows the image of a study participant with a reduction in erythema after 60 days of oral treatment.

em todos os tempos avaliados (ANOVA, p>0,05), assim como observado no mMASI (Figura 6). No entanto, resultados significativos foram detectados no índice de melanina quando os valores pareados para variação de tempo no grupo oral analisado individualmente (ANOVA RM, p = 0,0466) ao comparar o tempo inicial com 60 dias (p=0,0167)

O Mexameter também fornece quantificação de eritema que está relacionada à característica de aumento da vascularização do melasma. Os valores de eritema iniciais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, p = 0,277). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos após 90 dias (ANOVA, p = 0,290), o grupo oral apresentou maior diminuição do eritema em relação aos demais grupos (Figura 7). A Figura 8 mostra a imagem de uma participante com a redução no eritema após 60 dias do tratamento oral.

Discussion

Corresponding to the results obtained in epidemiologic studies by Handel at al. and Tamega et al. (25,26), the semi-structured interviews allowed the participants to report the most common triggering factor for melasma: solar radiation and hormonal alterations, including pregnancy or contraceptive use.

The demand for an effective treatment for melasma can be recognized by its chronic and relapsing characteristics, observed in this study as most of the participants had presented with the disorder for more than five years, and 71% had previously tried classical dermatodrlogical treatments containing hydroquinone. None of the patients had the melasma onset at less than 1 year. In addition, the dropout rate was equal in all groups and most occurred before 30 days of treatment. The period recommended for the first visual clinical affects for melasma is in 56 days (27).

In 2014, Jutley et al. performed a systematic review of melasma treatments, and determined the main limitation of the studies evaluated was poor methodology, with a lack of standardized outcome assessments (28). Therefore, to complement the subjective evaluation using mMASI score, the use of objective biophysical techniques is important for reproducible analysis in melasma clinical trials (29).

Despite the fact that no statistically significant alterations were observed in the mMASI scores, a reduction in all groups over time was observed, with a more pronounced pigmentation decrease after the oral treatment. Evaluating time as the main variable, in a single-arm or intragroup evaluation, the oral group presented significant reduction in mMASI when baseline values were compared to those after 60 and 90 days of treatment. It is important to emphasize that no reduction in melasma area parameter was observed in mMASI evaluation. Therefore, only pigmentation darkness showed decreased values in the score.

By the objective techniques, the melanin content presented similar results to mMASI, since no statistical difference was observed among treatment groups compared to the control at the evaluated times. However, a significant pigmentation decrease was noticed in the oral group when ANOVA RM was performed comparing 60 days to baseline, as a single-arm treatment.

The obtained results of the groups containing the olive extract compared to the control could indicate that hydroxytyrosol bioavailability at the basal layer of epidermis, where melanogenesis predominantly occurs, may have been lower than expected to exert its enzymatic competitive inhibition to tyrosinase in both oral

Discussão

Concordando com os resultados obtidos nos estudos epidemiológicos de Handel et al. e Tamega et al. (25,26), as entrevistas semiestruturadas permitiram aos participantes relatar os fatores desencadeantes mais comuns do melasma, em suas concepções: radiação solar e alterações hormonais, incluindo gravidez ou uso de contraceptivos.

A demanda por um tratamento efetivo para o melasma pode ser reconhecida por suas características crônicas e recidivantes, que foram observadas à maioria das participantes apresentarem a doença por mais de 5 anos e 71% já haviam experimentado o tratamento dermatológico clássico contendo hidroquinona. Nenhuma das pacientes tivera o início do melasma em menos de 1 ano. Além disso, a taxa de abandono foi igual em todos os grupos e ocorreu principalmente antes de 30 dias de tratamento. No entanto, o período recomendado para os primeiros efeitos clínicos visuais para o melasma é de 56 dias (27).

Em 2014, Jutley et al. realizaram uma revisão sistemática dos tratamentos com melasma e a principal limitação dos estudos avaliados foram que as metodologias usadas eram inadequadas, levando ao lapso de avaliações padronizadas dos resultados (28). Então, para complementar a avaliação subjetiva do pesquisador usando o escore mMASI, o uso de técnicas biofísicas objetivas são importantes para a análise reprodutível nos estudo s clínicos de melasma (27).

Apesar de não terem sido observadas alterações estatisticamente significantes no escore do mMASI, foi observada redução em todos os grupos ao longo do tempo, com diminuição da pigmentação mais pronunciada após o tratamento oral. Avaliando o tempo como a variável principal, em uma avaliação intragrupo ou single arm, o grupo oral apresentou redução significativa no mMASI quando os valores basais foram comparados àqueles após 60 e 90 dias de tratamento. É importante enfatizar que nenhuma redução no parâmetro da área do melasma foi observada na avaliação do mMASI. Portanto, apenas o parâmetro da escuridão da pigmentação apresentou valores reduzidos na pontuação.

Pelas medidas objetivas realizadas, o índice de melanina apresentou resultados semelhantes ao mMASI, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento em relação ao controle nos tempos avaliados. No entanto, uma diminuição significativa da pigmentação foi notada no grupo oral quando ANOVA RM foi realizada individualmente neste grupo comparando o tempo de 60 dias com o inicial.

and topical pathways. Both olive extracts used in the study had a standardized concentration of hydroxytyrosol: 3% in the oral and 20% in the topical. Even so, the topical cream containing 1% of the olive extract was the maximum recommended by the distributor. Hence, Alonso et al. showed that the in vitro hydroxytyrosol epidermal absorption profile have presented a low skin penetration through the stratum corneum and reduced skin permeation to dermis (29). This could be improved by the conversion of hydroxytyrosol into more lipophilic hydroxytyrosol esters.

Despite the wide distribution of hydroxytyrosol to all tissues, its bioavailability by the oral route is also poor, as only 2% of the free form can be found at plasma after its intake (11). Even so, the higher depigmenting effect observed in the oral treatments compared to topical could suggest that the oral treatment dosage of this substance may attain a major bioavailability at the target site (epidermal basal layer) when compared to the topical delivery in this study.

So, further studies with higher concentrations of hydroxytyrosol from olive extracts for topical and oral routes are suggested to verify its depigmenting potential.

It was possible to observe reduction of the erythema in the oral group, despite not being significant. This effect can be a result of the great anti-inflammatory activity of the hydroxytyrosol, which in vitro studies presents a reduced pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (30), which are involved in the increased vascular component in the lesion (31,6). As melasma presents with an increased vascular component in lesional skin associatedwith photoaging (32,5), erythema analysis was useful to assess the treatment response.

It is known that the therapies for melasma must not only target the tyrosinase inhibition but should have an anti-aging and anti-inflammatory approach (5,6). Hydroxytyrosol is a single agent that has multiple potential mechanisms to support restoring the basal membrane, acting against cytokines and other inflammatory factors, inhibiting tyrosinase and exerting potent antioxidant activity, as previously described. As a result, other studies with higher concentrations of hydroxytyrosol contained in olive extracts have great potential to assist as an adjunct to conventional dermatological melasma therapy or as a complementary long-term maintenance treatment for melasma.

Os resultados obtidos nos grupos contendo o extrato de oliva comparados ao controle podem indicar que a biodisponibilidade do hidroxitirosol na camada basal da epiderme, onde a melanogênese ocorre predominantemente, pode ter sido menor do que o esperado para exercer sua inibição competitiva enzimática na tirosinase tanto oral quanto tópica. caminhos. Ambos os extratos de oliva utilizados no estudo tinham uma concentração padronizada de hidroxitirosol: 3% na oral e 20% na tópica. Mesmo assim, o creme tópico contendo 1% deste extrato de oliva foi o máximo recomendado pelo distribuidor. Além disso, Alonso et al. mostraram que o perfil de absorção epidérmica de hidroxitirosol in vitro apresentou baixa penetração cutânea através do estrato córneo e permeação cutânea reduzida à derme (29). Isto poderia ser melhorado pela conversão do hidroxitirosol em tensoativos derivados de éster para aumentar a sua lipofilicidade.

Apesar de o hidroxitirosol apresentar ampla distribuição para todos os tecidos, sua biodisponibilidade por via oral também é baixa, apenas 2% da forma livre pode ser encontrada no plasma após sua ingestão (11). Mesmo assim, o maior efeito de despigmentação observado nos tratamentos orais em comparação com o tópico poderia sugerir que a dosagem do tratamento oral dessa substância pode atingir uma biodisponibilidade maior no local alvo (camada basal epidérmica) quando comparado ao tópico neste estudo. Assim, estudos posteriores com maiores concentrações de hidroxitirosol a partir de extratos de oliva para rotas tópicas e orais são sugeridos para verificar seu potencial despigmentante.

Foi possível observar redução do eritema no grupo oral, apesar de não significativa. Esse efeito pode ser resultado da grande atividade anti-inflamatória do hidroxitirosol que, em estudos in vitro, mostrou redução das citocinas pró-inflamatórias e a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) (30), que estão envolvidas no aumento do componente vascular na lesão (31,6). Como o melasma apresenta aumento do componente vascular associada ao fotoenvelhecimento (32,5), a análise do eritema foi interessante para avaliar essa resposta ao tratamento.

As terapias para o melasma não devem apenas visar a inibição da tirosinase, mas também devem ter uma abordagem antienvelhecimento e anti-inflamatória (5,6). Assim, o hidroxitirosol é um agente único que possui múltiplos mecanismos potenciais para restaurar a membrana basal, atuar contra citocinas e outros fatores inflamatórios, inibir a tirosinase e exercer uma atividade antioxidante potente, como descritas anteriormente. Assim, o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol tem um grande potencial

Conclusion

Considering the great interindividual variability that is an intrinsic melasma characteristic, the subjective and objective analysis showed no significant difference in the groups along time for the oral and topical treatment with the olive extract containing standardized concentration of hydroxytyrosol compared to placebo. However, the oral treatment reduced the mMASI and melanin index values after the 60 day usage period when compared to baseline values in intragroup analysis.
In addition, considering the described benefits, we suggest that further studies to test if an increased concentration of hydroxytyrosol could determine better results in the oral and topical treatments for melasma control.
Finally, this study contributes to better understanding of oral and topical treatments containing an ingredient with multiple beneficial pharmacological effects that presents great potential as an adjunctive to dermatological treatments for melasma control.

Acknowledgements

This study was financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Financial Code 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Conflicts of interest

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

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

Authors Contributions

JB collected data and contributed to writing; EB was responsible for clinical evaluation and supervision and result analysis; PMC coordinated the study, including conceptual design, writing and final revision.

para auxiliar como adjuvante à terapia dermatológica convencional do melasma ou como um tratamento complementar de manutenção de longo prazo pós-terapêutico para o melasma.

Conclusão

Considerando a grande variabilidade interindividual característica do melasma intrínseco, a análise subjetiva e objetiva não mostrou diferença significativa nos grupos ao longo do tempo para o tratamento oral e tópico com o extrato de oliva contendo concentração padronizada de hidroxitirosol comparado ao placebo. No entanto, o tratamento oral reduziu os valores do índice mMASI e melanina após 60 dias, quando comparado com os valores basais na análise intragrupo.
Além disso, considerando os benefícios descritos do extrato de oliva, sugere-se que novos estudos verifiquem se maiores concentração de hidroxitirosol poderia determinar melhores resultados nos tratamentos orais e tópicos para o controle do melasma.
Finalmente, este estudo contribui para uma melhor compreensão dos tratamentos orais e tópicos com um ingrediente com múltiplos efeitos farmacológicos benéficos de fontes naturais que apresentam grande potencial como adjuvante aos tratamentos dermatológicos para o controle do melasma.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Financial Code 001) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Conflitos de interesse

O editor senior envolvido na autoria deste manuscrito não teve qualquer participação no processo de revisão ou de decisão.

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

Contribuições dos Autores

JB coletou dados e contribuiu com a redação; EB foi responsável pela avaliação clínica, supervisão e análise de resultados; PMC coordenou o estudo, incluindo o desenho conceptual, redação e revisão final.

References / Referências

1. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. An Bras Dermatol 2014; 89(5):771–82.
2. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. J Eur Acad Dermatol Venereol 2009; 23:1254–62.
3. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, et al . Epidemiology of melasma in B razilian patients: a multicenter study. Int J Dermatol 2014; 53(4): 440-444.
4. Ikino JK, Nunes DH, da Silva VPM, et al. Melasma and assessment of the quality of life in Brazilian women. An Bras Dermatol 2015; 90(2):196–200.
5. Passeron T, Picardo M. Melasma, a photoaging disorder. Pigment Cell Melanoma Res 2018; 31(4):461-465.
6. Kwon SH, Hwang YJ, Lee SK, Park KC. Heterogeneous pathology of melasma and its clinical implications. Int J Mol Sci 2016; 17(6):824.
7. Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Physiopathology of melasma. An Bras Dermatol 2009; 84(6):623–35.
8. Lee SY, Baek N, Nam T. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem 2016; 31(1):1-13.
9. Khan M. Novel tyrosinase inhibitors from natural resources–their computational studies. Curr Med Chem 2012; 19(14):2262-2272.
10. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. Int J Mol Sci 2009; 10(6):2440- 2475.
11. Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. Food Res Int 2017; 105:654-667.
12. Hu T, He XW, Jiang JG, Xu XL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. J Agric Food Chem 2014; 62(7):1449-1455.
13. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247(1):60-64.
14. Rodrigues M, Pandya AG. Melasma: clinical diagnosis and management options. Australas J Dermatol 2015; 56(3):151-163.
15. Lee, A. Recent progress in melasma pathogenesis. Pigment Cell Melanoma Res. 2015; 28(6): 648-660.
16. Scoditti E, Nestola A, Massaro M, et al. Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKCalpha and PKCbeta1 inhibition. Atherosclerosis 2014; 232(1):17–24.
17. Torres-Alvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cazares JP, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. Am J Dermatopathol 2011; 33:291–5.
18. Fitzpatrick T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol 1988; 124 (6):869-871.
19. Urbaniak, G. C., & Plous, S. (2015). Research Randomizer (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved on May 2017, from http://www.randomizer.org/
20. Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. J Am Acad Dermatol 2011; 64:78–83.
21. Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. Acta Pharm Sin B 2014, 4:141–5.
22. Guo, W, An Y, Jiang L, Geng C, Zhong L. The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells. Phytother Res 2010; 24(3):352–359.
23. Zwane RE, Parker A, Kudanga T, et al. Novel biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. J Agric Food Chem 2012; 60(46):11509–11517.
24. Salucci S, Burattini S, Curzi D, et al. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. J Photochem Photobiol B. 2014; 141:1–9.
25. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. An Bras Dermatol 2014; 89(5):771–82.
26. Tamega A, Miot LDB, Bonfietti C, et al. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013; 27:151–6.
27. Pandya A, Berneburg M, Ortonne JP, Picardo M. Guidelines for clinical trials in melasma. Pigmentation Disorders Academy. Br J Dermatol 2016, 156 (1):21–8.
28. Jutley G, Rajaratnam R, Halpern J, et al. Systematic review of randomized controlled trials on interventions for melasma: an abridged Cochrane review. J Am Acad Dermatol. 2014; 70(2):369–73.
29. Alonso C, Lucas R, Barba C, et al. Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol. J Pharm Pharmacol 2016; 67(7):900-908.
30. Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2009; 379(6):581–586.
31. Jo HY, Kim CK, Suh IB, et al. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and phosphorylated Akt in the lesional skins of patients with melasma. J. Dermatol. 2009; 36:10–16.
32. Na JI, Choi SY, Yang SH, et al. Effect of tranexamic acid on melasma: a clinical trial with histological evaluation. J Eur Acad Dermatol Venereol 2013; 27(8):1035–9.

.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biomedical Sciences | *Ciências Biomédicas* *Biomed Biopharm Res.,* 2020; 17(1): 63-74

doi: 10.19277/bbr.17.1.225

In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids on human renal cancer cells

Avaliação da citotoxicidade in vitro dos ácidos ferúlico, cafeico e p-cumárico em células renais tumorais humanas

Rita Caparica [1,2], Ana Júlio [1,2], André Rolim Baby [3], Tânia Santos de Almeida [1,4,#], and João Guilherme Costa [1,#]

[1]CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal; [2]Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain; [3]Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 15, São Paulo, SP 05508-900, Brazil; [4]CQB, CQE and Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Campo Grande 1749-016 Lisbon, Portugal

Shared senior authorship

Corresponding authors: tania.almeida@ulusofona.pt; jgcosta@ulusofona.pt

Abstract

Bioactive compounds from natural sources have been extensively studied as potential therapeutic agents, due to their chemical, structural, and biological properties. Among them, hydroxycinnamic acids emerge with a very interesting pharmacological potential to prevent and treat several diseases, including cancer. However, while some studies support their anticancer activity, other reports indicate otherwise. Since the impact of these compounds on renal cancer is not well established, further studies are needed to better understand their biological effects and their potential therapeutic uses in this cancer.

In this work, the cytotoxicity of three hydroxycinnamic acids: ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids, was evaluated on 786-O human renal cancer cells by MTT and CV assays. At concentrations up to 250 µM, none of the studied natural compounds showed cytotoxic effects to 786-O cell line. At higher concentrations (500 and 1000 µM), while ferulic acid also did not significantly influence the cell viability of 786-O cells, *p*-coumaric and caffeic acids decreased the renal cancer cells viability. Nevertheless, further studies on the biological activity of these compounds, using other methodologies, as well as using other cancer cell models, should be performed.

Keywords: Ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, cytotoxicity, 786-O cells

Resumo

Os compostos bioativos provenientes de produtos naturais têm sido amplamente estudados como potenciais agentes terapêuticos, devido às suas propriedades químicas, estruturais, e biológicas. De entre estes, os ácidos hidroxicinâmicos emergem com um potencial farmacológico muito interessante para prevenir e tratar várias doenças, incluindo o cancro. No entanto, enquanto alguns estudos demonstram a sua atividade antitumoral, outros estudos indicam o oposto. Uma vez que o impacto desses compostos no cancro renal não está bem estabelecido, são necessários mais estudos para compreender melhor os seus efeitos biológicos e os seus potenciais usos terapêuticos neste cancro.

Neste trabalho, a citotoxicidade de três ácidos hidroxicinâmicos: ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico foi avaliada em células tumorais renais humanas 786-O, através dos ensaios do MTT e do CV. Nenhum dos compostos naturais estudados, até 250 µM, mostrou efeitos citotóxicos na linha celular 786-O. A concentrações acima de 250 µM, enquanto que o ácido ferúlico não influenciou significativamente a viabilidade celular das células 786-O, os ácidos *p*-cumárico e cafeico diminuiram a viabilidade das células renais tumorais. No entanto, novos estudos sobre a atividade biológica destes compostos, utilizando outras metodologias, bem como outros modelos celulares tumorais, devem ser realizados.

Palavras-chave: Ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, citotoxicidade, células 786-O

Received / *Recebido*: 25/10/2019
Accepted / *Aceite*: 13/02/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Natural resources, such as plants, remain one of the most significant origins of active compounds for therapeutic applicability due to their unique properties, such as their chemical and structural diversity (1,2). Among them, phenolic compounds are likely the most explored natural compounds due to their potential health benefits (3-5).

Phenolic compounds, naturally produced by plants, are very well-known bioactive compounds. In the plant kingdom, phenolics represent the second most abundant group of organic compounds and are derived from shikimate, pentose phosphate, and phenylpropanoid pathways (6). Their structure consists of an aromatic ring containing at least one hydroxyl group (6,7). Due to their chemical, structural, and known biological properties, phenolic compounds have been extensively studied as potential therapeutic agents. (3,8,9). Several studies describe the beneficial effects of these natural compounds, including their antitumor and antioxidant activities (6,10-15).

Phenolic compounds can be classified into two main groups: flavonoids and non-flavonoids. Phenolic acids, flavonoids, and tannins represent some of their subclasses, which are the most important in the human diet (6,7,16). Among them, phenolic acids are amongst the bioactive compounds most commonly found in plants. Phenolic acids are divided into two main groups, the hydroxycinnamic acids (eg. cinnamic, ferulic, sinapic acids) and the hydroxybenzoic acids (e.g., gallic, vanilic and p-hydroxybenzoic acids) comprised by nine- and seven-carbon structure, respectively (2,4,8,17).

The hydroxycinnamic acids are the largest group of phenolic acids, and some studies have shown their benefits to human health, particularly in preventing diseases that may be caused by oxidative stress, such as cancer or inflammatory and cardiovascular diseases (2,18). Thus, in this context, and to explore the biological potential of these compounds, three hydroxycinnamic acids: ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids (Figure 1) were selected for this study.

Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) and *p*-coumaric acid (3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid) are commonly present in dietary sources, such as plants (e.g., bamboo shoots, eggplant, ginseng), cereals (e.g., corn, rice, wheat), vegetables (e.g., radish, beans, red beet), beverages (e.g., coffee, wine), and fruits (e.g., orange, grapefruit, apples) (2,17,19-22). The amount of these hydroxycinnamic acids present in the previously mentioned sources varies greatly. For example, the presence

Introdução

Os recursos naturais, como as plantas, continuam a ser uma das fontes mais relevantes de compostos ativos com aplicabilidade terapêutica, devido às suas propriedades únicas, como a sua diversidade química e estrutural (1,2). Entre eles, os compostos fenólicos são provavelmente os compostos naturais mais explorados, devido aos seus potenciais benefícios para a saúde (3-5).

Os compostos fenólicos, produzidos naturalmente pelas plantas, são compostos bioativos bem conhecidos. No reino vegetal, estes compostos são o segundo grupo mais abundante de compostos orgânicos e derivam das vias xikimato, pentose-fosfato e fenilpropanóide (6). A sua estrutura consiste num anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxilo (6,7). Devido às suas propriedades químicas, estruturais e biológicas conhecidas, os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados como potenciais agentes terapêuticos (3,8,9). Vários estudos descrevem os efeitos benéficos desses compostos naturais, incluindo as suas atividades antitumorais e antioxidantes (6,10-15).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos principais: flavonóides e não flavonóides. Os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos representam algumas das suas subclasses, as quais são as mais importantes na dieta humana (6,7,16). Entre eles, os ácidos fenólicos estão entre os compostos bioativos que são mais comuns encontrar em plantas. Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos principais, os ácidos hidroxicinâmicos (ex. ácidos cinâmico, ferúlico, sinápico) e os ácidos hidroxibenzóicos (ex. ácidos gálico, vanílico e p-hidroxibenzóico), constituídos por uma estrutura de nove e sete carbonos, respetivamente (2,4,8,17).

Os ácidos hidroxicinâmicos são o maior grupo de ácidos fenólicos e alguns estudos têm demonstrado os seus benefícios na saúde humana, particularmente na prevenção de doenças que podem ser causadas pelo stresse oxidativo, como cancro ou doenças inflamatórias e cardiovasculares (2,18).

Assim, neste contexto e para explorar o potencial biológico destes compostos, três ácidos hidroxicinâmicos: os ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico (Figura 1) foram selecionados para serem estudados.

O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), o ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) e o ácido *p*-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico) encontram-se habitualmente presentes na dieta alimentar, como em plantas (ex. rebentos de bambu, beringela, ginseng), cereais (ex. milho, arroz, trigo), legumes (ex.

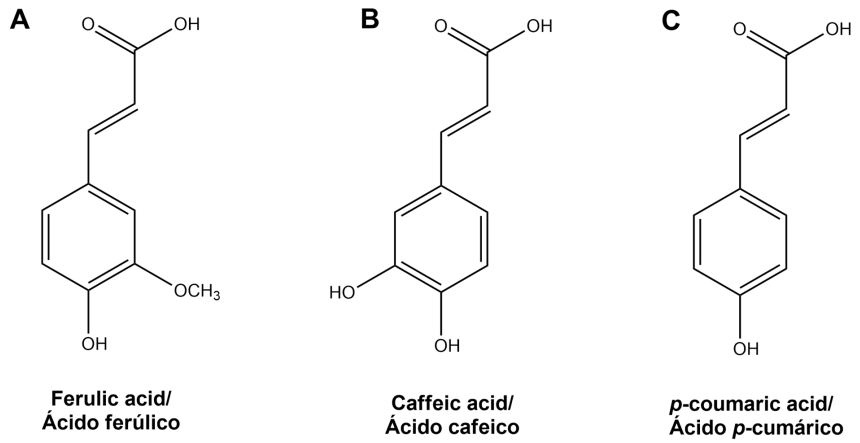


Figure 1 - Chemical structure of the ferulic acid (A), caffeic acid (B) and *p*-coumaric acid (C)
Figura 1 - Estrutura química do ácido ferúlico (A), ácido cafeico (B) e ácido *p*-cumárico (C)

of *p*-coumaric acid may range from 0.5 mg/ kg dry matter (DM) in blackberries to 3700 mg/ kg DM in mushrooms (21).

The synthesis of these hydroxycinnamic acids in plants occurs through the shikimate pathway, starting with L-phenylalanine and/or L-tyrosine as precursors. Briefly, phenylalanine and tyrosine are converted into *p*-coumaric acid that is then hydroxylated to form caffeic acid that forms ferulic acid by methylation (2,6,20).

Considering the biological activity of these phenolic acids, many studies have shown the wide range of biologic effects of ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids (2,5,15,17,19-22). Nonetheless, there are some controversial reports concerning the anticancer potential of the studied phenolic acids. Therefore, it is essential to conduct more studies in various cell models to attempt to clarify the biological activity and the potential therapeutic use of these bioactive compounds. The carcinogenic potential of these compounds should also be considered, as there are some studies reporting this effect for caffeic acid (17).

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer, representing up to 5% of all adult malignancies. Furthermore, since this type of kidney cancer is highly vascularized, metastatic, and has a low response to adjuvant therapies and surgery, it is relevant to find new and more effective treatments (23-27). Bearing all of this in mind, the aim of this work was to perform an overall review of the impact of ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids on different tumor cell lines and to experimentally study the impact

rabanete, feijão, beterraba vermelha), bebidas (ex. café, vinho) e frutas (ex. laranja, toranja, maçã) (2,17,19-22). A quantidade destes ácidos hidroxicinâmicos presentes nas fontes mencionadas anteriormente varia muito. Por exemplo, a presença de ácido *p*-cumárico pode variar de 0,5 mg/kg de matéria seca (MS) em amoras a 3700 mg/kg MS em cogumelos (21).

A síntese desses ácidos hidroxicinâmicos nas plantas ocorre através da via do xikimato, começando com L-fenilalanina e/ou L-tirosina como precursores. Resumidamente, a fenilalanina e a tirosina são convertidas em ácido *p*-cumárico, que é posteriormente hidroxilado para formar o ácido cafeico que por sua vez origina o ácido ferúlico por metilação (2,6,20).

Considerando a atividade biológica desses ácidos fenólicos, muitos estudos têm demonstrado a ampla gama de efeitos biológicos dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico (2,5,15,17,19-22). No entanto, no que se refere ao potencial antitumoral dos ácidos fenólicos estudados, existem alguns resultados controversos. Portanto, é essencial realizar mais estudos em vários modelos celulares, com o intuito de esclarecer a atividade biológica e o potencial uso terapêutico destes compostos bioativos. O potencial carcinogénico destes compostos também deve ser considerado, uma vez que existem alguns estudos que reportam este efeito para o ácido cafeico (17).

O carcinoma de células renais (CCR) é o tipo mais comum de cancro renal, representando até 5% de todas as doenças malignas em adultos. Para além disto, como este tipo de cancro renal é altamente vascularizado, metastático e apresenta uma baixa resposta às terapêuticas adjuvantes e à cirurgia, é relevante encontrar tratamentos novos e mais eficazes (23-27). Tendo tudo isto em consideração, o objetivo deste trabalho foi realizar

of these compounds on the well-established 786-O *in vitro* human renal cancer cell model. To the best of our knowledge, there are no previous *in vitro* studies that evaluate the effect of these compounds on human renal cancer.

Materials and Methods

Materials

The following reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), phosphate buffered saline (PBS; 0.01 M, pH 7.4), trypsin, penicillin–streptomycin (pen/strep) solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, acetic acid, hydrogen peroxide (H_2O_2), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), crystal violet (CV), *p*-coumaric acid, and caffeic acid. Fetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) were purchased from Biowest (Nuaillé, France). Ferulic acid was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil).
Ferulic acid, *p*-coumaric acid, and caffeic acid solutions were prepared in DMSO. The final concentration of DMSO was 0.5 % (v/v) for all experiments.

Cell Culture

The 786-O human adenocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Cells were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% pen/strep, at 37 ºC in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

MTT assay

Cell viability was determined using the MTT reduction assay. 786-O cells were seeded at a density of 3 x 10^3 per well in 96-well plates and incubated for 24 h. Afterward, cells were treated with ferulic acid, *p*-coumaric acid or caffeic acid (0–250 µM) for 48 h. A solution of H_2O_2 (1 mM) was used as a positive control, while 0.5% (v/v) of DMSO was used as vehicle control. The MTT reduction assay was then performed according to previously published procedures (28,29). Absorbance values for the vehicle-treated control cells correspond to 100% of cell viability. For this assay, at least two independent experiments were carried out and at least six replicates were used for each condition in each independent experiment.

uma revisão geral do impacto dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico em diferentes linhas celulares tumorais e estudar experimentalmente o impacto destes compostos nas células 786-O, um modelo *in vitro* de cancro renal humano bem estabelecido. Adicionalmente, tanto quanto sabemos não existem estudos prévios *in vitro* que avaliem o efeito destes compostos em cancro renal humano.

Materiais e Métodos

Materiais

Os reagentes e solventes utilizados adquiridos à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) foram o tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4), a tripsina, a solução de penicilina-estreptomicina, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etanol, o ácido acético, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o brometo de tetrazólio azul de tiazolil (MTT), o cristal violeta (CV), o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico. O soro bovino fetal (FBS) e o meio de cultura Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (DMEM) foram adquiridos à Biowest (Nuaillé, França). O ácido ferúlico foi obtido pela Henrifarma (São Paulo, Brasil).
Os ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico foram preparados em DMSO. A concentração final de DMSO foi de 0.5% (v/v) em todas as experiências realizadas.

Cultura celular

As células de adenocarcinoma humano 786-O foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM com elevada concentração de glucose suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de penicilina-estreptomicina e mantidas a 37 ºC sob uma atmosfera húmida contendo 5% de CO_2.

Ensaio de redução de MTT

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de redução do MTT. Para tal, as células 786-O foram cultivadas a uma densidade de 3 x 10^3 por poço, em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico (0–250 µM) durante 48 h. Como controlo positivo foi usada uma solução de H_2O_2 (1 mM), enquanto o DMSO (0.5%, v/v) foi usado como veículo. Após este período, o ensaio de redução de MTT foi realizado de acordo com protocolos descritos previamente (28,29). Os valores de absorvância para as células tratadas com o veículo (controlo) correspondem a 100% da viabilidade celular. Para este ensaio, foram

Crystal violet (CV) staining assay

The CV staining assay was carried out as a confirmatory assay to evaluate the impact of phenolic compounds on cell viability. First, 786-O cells were cultured at a density of 3 x 10^3 per well, in 96-well plates, and incubated for 24 h. Then, cells were treated with ferulic, *p*-coumaric or caffeic acids (0–1000 µM) for 48 h. A solution of H_2O_2 (1 mM) was used as a positive control while 0.5% (v/v) of DMSO was used as vehicle control. The CV staining assay was then performed according to previously published protocols (12, 29-31). Absorbance values for the vehicle-treated control cells correspond to 100% of cell viability. For this assay, at least two independent experiments were carried out and six replicates were used for each condition in each independent experiment. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated using *GraphPad Prism 7*® statistical software (San Diego, CA, USA).

efetuadas pelo menos duas experiências independentes e usados pelo menos seis replicados para cada condição em cada uma das experiências independentes.

Ensaio colorimétrico do cristal violeta (CV)

O ensaio colorimétrico do CV foi utilizado como ensaio confirmatório para avaliar o impacto dos compostos fenólicos na viabilidade celular.Inicialmente, as células 786-O foram cultivadas a uma densidade de 3 x 103 células por poço, em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico (0–1000 µM) durante 48 h. Uma solução de H_2O_2 (1 mM) foi usada como controlo positivo, enquanto o DMSO (0.5 %, v/v) foi usado como veículo. Em seguida, o ensaio colorimétrico do CV foi realizado de acordo com protocolos publicados anteriormente (12, 29-31). Os valores de absorvância para as células tratadas com o veículo (controlo) correspondem a 100% da viabilidade celular. Para este ensaio, foram efetuadas pelo menos duas experiências independentes e usados seis replicados para cada condição em cada uma das experiências independentes. A metade da concentração máxima inibitória (IC_{50}) foi calculada utilizando o software estatístico *GraphPad Prism 7*® (San Diego, CA, USA).

Results and Discussion

In previous studies, ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids have shown biological activity towards different tumor cell lines, indicating that these compounds could be promising anticancer agents. Nonetheless, there are also studies in which this class of bioactive compounds did not exhibit anticancer properties.

To the best of our knowledge, there are no previous studies that evaluate the influence of these compounds on cell viability using renal cancer cell models. Hence, in this work, the cytotoxicity of ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids was evaluated in 786-O cells through two different methodologies, the MTT reduction assay and the CV staining assay.

The MTT reduction assay is one of the most common assays used to evaluate the cytotoxicity of potential anticancer compounds. This assay is based on the assumption that the mitochondrial activity of the most viable cells is constant and the reduction of MTT tetrazolium salt into formazan occurs in the mitochondria of living cells. Thus, an increase or decrease in the number of viable cells depend linearly on their mitochondrial activity (33,34). In this study, the MTT reduction assay results revealed that the

Resultados e Discussão

Estudos anteriores demonstram que os ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico apresentam atividade biológica em diferentes linhas celulares, indicando que estes compostos poderão ser promissores agentes antitumorais. No entanto, também existem estudos, nos quais esta classe de compostos bioativos não exibiram propriedades anticancerígenas.

De acordo com o nosso conhecimento, não existem estudos prévios que avaliem a influência destes compostos na viabilidade celular, utilizando modelos celulares de cancro renal. Desta forma, neste trabalho a citotoxicidade dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico foi avaliada nas células 786-O através de duas metodologias distintas, o ensaio de redução de MTT e o ensaio colorimétrico com CV.

O ensaio de redução de MTT é um dos ensaios mais usados para avaliar a citotoxicidade de potenciais compostos antitumorais. Este ensaio baseia-se no pressuposto de que a atividade mitocondrial das células mais viáveis é constante e que a redução do sal MTT tetrazólio em formazan ocorre nas mitocôndrias das células vivas. Assim, um aumento ou diminuição do número de células viáveis depende linearmente da atividade mitocondrial das mesmas (33,34). Neste

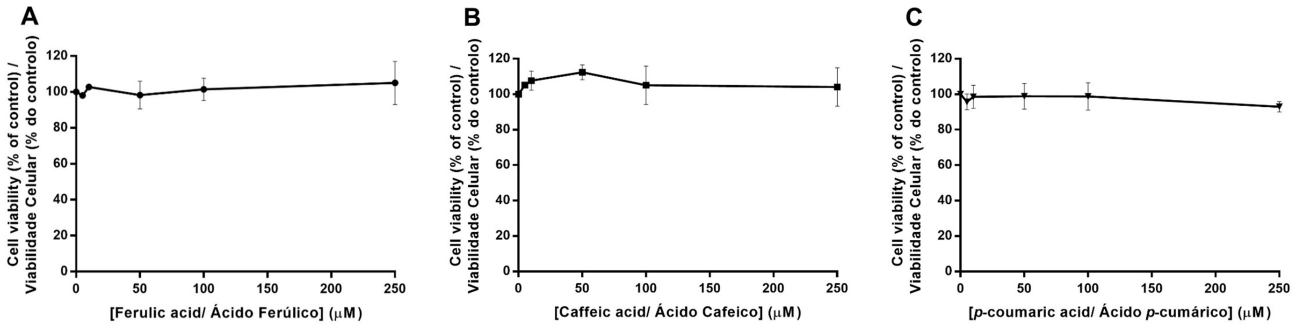


Figure 2 - Cell viability of 786-O cells exposed to ferulic acid (A), caffeic acid (B) and *p*-coumaric acid (C) (0-250 μM; 48 h). The cell viability was evaluated by the MTT assay. Values represent mean ± SD (n = 2-3) and are expressed as percentages of the non-treated control cells.

Figura 2 - Viabilidade celular das células 786-O expostas ao ácido ferúlico (A), ácido cafeico (B) e ácido *p*-cumárico (C) (0-250 μM; 48 h). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. Os valores representam a média ± DP (n = 2-3) e estão expressos como percentagens das células controlo não tratadas.

studied compounds (0-250 μM; 48 h) did not show cytotoxic effects on this cell line when compared with the non-treated control cells (Figure 2). At the highest studied concentration (250 μM; 48 h) of ferulic acid, caffeic acid, and *p*-coumaric acid, the cell viability observed was similar to that of control cells, being 111.1%, 104.1% and 92.9%, respectively. Since MTT reduction assay can be influenced by compounds that modify the cell metabolism and reaction conditions, a confirmatory methodology, the CV staining assay was performed. Moreover, in CV assay, a higher range of concentrations of ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids (up to 1000 μM) was used.

The CV staining assay is a non-enzymatic assay that quantifies the number of adherent cells. This assay is based on the affinity between dye and DNA (34). The amount of dye absorbed depends on the total DNA content in the culture and, consequently, on the number of viable cells. Although the CV staining assay does not provide information about cell functionality, as it is metabolism-independent (34). In this work, after 48 h treatment, the CV staining assay revealed that none of the studied compounds showed cytotoxic effects at concentrations up to 250 μM (Figure 3), which is in agreement with our previous results obtained with the MTT assay. Nevertheless, a different impact on cell viability was observed when 786-O cells were exposed to higher concentrations (500 and 1000 μM) of ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids (Figure 3). The exposure to the higher concentrations of ferulic acid (500 and 1000 μM) continues to not significantly influence the cell viability of 786-O cells, with these values being 109.5 % and 104.5 %, respectively. On the other hand,

estudo, os resultados do ensaio de redução de MTT revelaram que os compostos estudados (0-250 μM; 48 h) não demonstraram efeitos citotóxicos nesta linha celular, quando comparados com as células controlo não tratadas (Figura 2). À concentração mais elevada estudada (250 μM; 48 h) dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico, a viabilidade celular foi semelhante à viabilidade celular obtida das células controlo, obtendo-se 111,1%, 104,1% e 92,9%, respetivamente. Uma vez que o ensaio de redução do MTT pode ser influenciado por compostos que modificam o metabolismo celular e as condições da reação, foi realizada uma metodologia confirmatória, o ensaio colorimétrico do CV. Adicionalmente, no ensaio colorimétrico do CV, foi usado um maior intervalo de concentrações dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico (até 1000 μM).

O ensaio colorimétrico do CV é um ensaio não enzimático que quantifica o número de células aderentes. Este ensaio é baseado na afinidade entre o corante e o ADN (33). A quantidade de corante absorvido depende do conteúdo total de ADN na cultura e, consequentemente, do número de células viáveis. No entanto, o ensaio colorimétrico do CV não fornece informações sobre a funcionalidade celular, uma vez que é independente do metabolismo (34). Neste estudo, após um tratamento de 48 h, o ensaio colimétrico do CV revelou que nenhum dos compostos estudados apresentou efeitos citotóxicos às concentrações até 250 μM (Figura 3), estando de acordo com os nossos resultados previamente obtidos com o ensaio de redução do MTT. No entanto, observou-se um impacto diferente na viabilidade celular quando as células 786-O foram expostas a concentrações mais elevadas (500 e 1000 μM) dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico

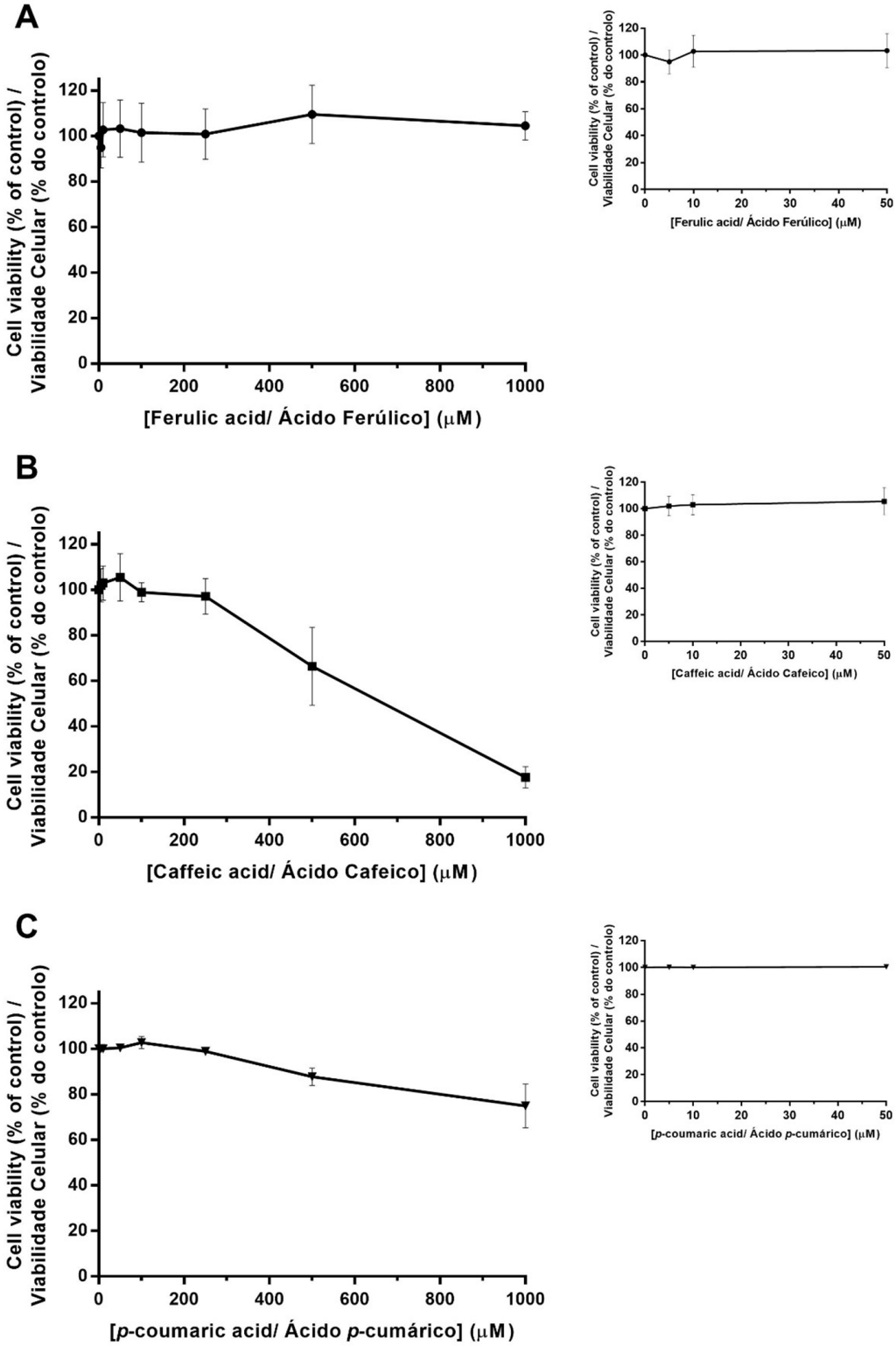


Figure 3 - Cell viability of 786-O cells exposed to ferulic acid (A), caffeic acid (B) and *p*-coumaric acid (C) (0-1000 μM; 48 h). The cell viability was evaluated by the CV assay. Values represent mean ± SD (n = 2-4) and are expressed as percentages of the non-treated control cells. Cell viability of non-treated control cells is shown to the right of each graph.

Figura 3 - Viabilidade celular das células 786-O expostas ao ácido ferúlico (A), ácido cafeico (B) e ácido *p*-cumárico (C) (0-1000 μM; 48 h). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do CV. Os valores representam a média ± DP (n = 2-4) e são expressos como percentagens das células controlo não tratadas. A viabilidade celular das células controlo não tratadas é monstrada à direita da cada gráfico.

for *p*-coumaric acid, the results showed cytotoxic effects at the highest concentration evaluated (1000 μM), with cell viability of 74.97%. Interestingly, for caffeic acid, a significant decrease in cell viability was observed at the concentration of 500 μM, when compared with the non-treated control cells, reaching 66.4% and decreasing to 17.7% at the concentration of 1000 μM. The IC_{50} calculated for the exposure of 786-O cells to caffeic acid (48 h) was 603.4 μM. Thus, the cell viability results obtained with CV assay revealed that 786-O cells were more sensitive to caffeic acid, followed by *p*-coumaric acid and then ferulic acid. However, these results obtained for caffeic and *p*-coumaric acids only occur at higher concentrations. Therefore, further studies should be performed using these two bioactive compounds, to understand their safety in non-tumor renal cell lines.

Globally, the results are in accordance with previously published works using other tumor cell lines (Table 1). For instance, in a previous study from our group, performed in another cancer cell line (MDA-MB-231 cells) and using similar experimental conditions (0-250 μM; 48 h; CV staining assay), the ferulic acid did not significantly affect the cell viability (15). In another study, using a different renal cancer cell line (769-P), it was observed that ferulic acid (50 μM; 48 h; MTT assay) did not significantly suppress cell proliferation (35). Moreover, Serafim et al. (18) also observed that ferulic acid (0-75 μM; 24, 48, or 72 h; sulforhodamine B assay) did not inhibit the proliferation of human breast cancer cell lines, including the MDA-MB-231 cells. In another study from our group with U2OS cells (0-1000 μM; 24 h; CV assay), ferulic acid did not induce a significant decrease in cell viability (36). Furthermore, other reports also revealed that caffeic acid (0-75 μM; 24, 48, or 72 h; sulforhodamine B assay) did not exhibit cytotoxic effects on human breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231, and HS578T) (18). In a previous report with *p*-coumaric acid (0-10 mM; 48 h; MTT assay) at concentrations higher than 750 μM, cytotoxic effects in colon carcinoma (HT 29) and human colorectal carcinoma (HCT-15) cells were observed (37).

Even though there are certain studies in accordance with our results, there are also some *in vitro* studies that demonstrated that these compounds not only decrease the cell viability and the cell proliferation but also induce apoptosis in different cancer cell lines (Table 1), using a concentration range similar to ours (38-42). For example, in a previous study, it was reported that ferulic acid, at concentrations up to 100 μM, decreased breast cancer MDA-MB-231 cell viability (38). Moreo-

(Figura 3). A exposição a concentrações mais elevadas de ácido ferúlico (500 e 1000 μM) continuou a não influenciar significativamente a viabilidade celular das células 786-O, sendo a mesma igual a 109,5% e 104,5%, respetivamente. Por outro lado, para o ácido *p*-cumárico os resultados revelaram efeitos citotóxicos à concentração mais elevada estudada (1000 μM), obtendo-se uma viabilidade celular de 74,97 %. Curiosamente, para o ácido cafeico foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular à concentração de 500 μM, em comparação com as células controlo não tratadas, obtendo-se um valor de 66,4% que diminui para 17,7% à concentração de 1000 μM. O valor de IC_{50} calculado para a exposição das células 786-O ao ácido cafeico (48 h) foi de 603.4 μM. Assim, estes resultados de viabilidade celular obtidos com o ensaio colorimétrico do CV, revelaram que as células 786-O foram mais sensíveis ao ácido cafeico, em seguida ao ácido *p*-cumárico e depois ao ácido ferúlico. No entanto, estes resultados obtidos para os ácidos cafeico e *p*-cumárico só ocorrem às concentrações mais elevadas. Desta forma, mais estudos devem ser efetuados utilizando estes dois compostos bioativos, para compreender a sua segurança em linhas celulares renais não tumorais.

Globalmente, os resultados estão de acordo com outros trabalhos previamente publicados utilizando outras linhas celulares tumorais (Tabela 1). Por exemplo, num estudo previamente realizado pelo nosso grupo, utilizando outra linha celular tumoral (células MDA-MB-231) e em condições experimentais semelhantes (0-250 μM; 48 h, ensaio colorimétrico do CV), o ácido ferúlico não afetou significativamente a viabilidade celular (12). Num outro estudo, utilizando uma linha celular de cancro renal diferente (769-P), observou-se que o ácido ferúlico (50 μM; 48 h; ensaio redução do MTT) não suprimiu significativamente a proliferação celular (34). Para além disto, Serafim e colaboradores (16) também observaram que o ácido ferúlico (0-75 μM; 24, 48 ou 72 h; ensaio sulforodamina B) não inibiu a proliferação de linhas celulares humanas de cancro da mama, incluindo as células MDA-MB-231. Num outro estudo previamente realizado pelo nosso grupo com células U2OS (0-1000 μM; 24 h; ensaio colorimétrico do CV), o ácido ferúlico não induziu uma diminuição significativa da viabilidade celular (35). Adicionalmente, outros estudos também revelaram que o ácido cafeico (0-75 μM; 24, 48 ou 72 h; ensaio sulforodamina B) não apresentou efeitos citotóxicos em células humanas de cancro da mama (MCF-7, MDA-MB-231 e HS578T) (18). Num estudo prévio com o ácido *p*-cumárico (0-10 mM; 48 h; ensaio de redução do MTT)a concentrações superiores a 750 μM, não foram observados efeitos citotóxi-

Table 1 - Overview of the cytotoxic effects of the three phenolic acids under study (ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids) in different cancer cell lines

Tabela 1 - Visão geral dos efeitos citotóxicos dos três ácidos fenólicos em estudo (ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico) em diferentes linhas celulares tumorais

Compound / *Composto*	**Cell line / *Linha celular***	**Concentration / *Concentração* (µM)**	**Time of exposure / *Tempo de exposição* (hours/ *horas*)**	**Assay / *Ensaio***	**Results / *Resultados***	**References / *Referências***
Ferulic acid / *Ácido ferúlico*	MDA-MB-231	5-250	48	CV staining / *Colorimétrico do CV*	No cytotoxic effects / *Sem efeitos citotóxicos*	(15)
	MCF-7 MDA-MB-231 HS578T	25-75	24, 48, 72, 168	Sulforhodamine B / *Sulforodamina B*	Cell proliferation not inhibited / *Sem inibição da proliferação celular*	(18)
	MDA-MB-231	3-100	24, 48, 72	CCK-8 kit	Cell viability decreased / *Diminuição da viabilidade celular*	(38)
	769-P	5, 50	48	MTT	Cell proliferation not suppressed / *Proliferação celular não suprimida*	(35)
	U2OS	1- 1000	24	CV staining / *Colorimétrico do CV*	Cell viability decreased / *Diminuição da viabilidade celular*	(36)
	A549 HT29-D4	50-1000	24	MTT	Cell proliferation inhibited / *Inibição da proliferação celular*	(42)
Caffeic acid / *Ácido cafeico*	MCF-7 MDA-MB-231 HS578T	25-75	24, 48, 72, 168	Sulforhodamine B / *Sulforodamina B*	No cytotoxic effects / *Sem efeitos citotóxicos*	(18)
	MDA-MB-231	10-100	24, 48	XTT Sulforhodamine B / *Sulforodamina B* Neutral red / *Vermelho neutro*	Cell viability decreased / *Diminuição da viabilidade celular*	(39)
	Caco-2 cells	50-1000	24	MTT	Anti-proliferative effects / *Efeitos anti-proliferativos*	(40)
	A549 HT29-D4	50-1000	24	MTT	Cell proliferation inhibited / *Inibição da proliferação celular*	(42)
p-Coumaric acid / *Ácido p-cumárico*	HT 29 HCT-15	50-10000	48	MTT	Cytotoxic effects / *Efeitos citotóxicos*	(37)
	N2a	150	24, 48, 72	MTT	Cytotoxic effects/ *Efeitos citotóxicos*	(41)
	A549 HT29-D4	50-1000	24	MTT	Cell proliferation inhibited / *Inibição da proliferação celular*	(42)

ver, in another study, using the same cell line and the XTT, sulforhodamine B, and neutral red assays, after a 24 or 48 h period of exposure to caffeic acid (10-100 μM), the cell viability decreased in a concentration-dependent manner (39). In another study, using the MTT assay, it was also observed that caffeic acid (50-1000 μM, 24 h) led to an anti-proliferative effect in Caco-2 cells (40). Moreover, another research study revealed that *p*-coumaric acid (150 μM) decreased the cell viability of neuroblastoma cells, being this decrease more significant after 72 h of treatment (41). Furthermore, Bouzaiene et al. (2015), also observed that the exposure to ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids (50-1000 μM, 24 h, MTT assay) significant inhibited, in a concentration-dependent manner, the proliferation of human lung (A549) and colon (HT29-D4) cancer cells (42). These discrepancies between studies can be related to different experimental conditions used as well as to some inherent cellular mechanisms of each cell type. These studies prove the importance of using different methodologies, experimental conditions, and models when evaluating the possible applicability of phenolic acids as anticancer agents.

Conclusion

In this study, we investigated the cytotoxicity of ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acids in a human renal cancer cell line. Our results revealed that up to 250 μM, none of the studied natural compounds showed cytotoxic effects on the 786-O cell line under our experimental conditions. Nonetheless, at higher concentrations, in the presence of caffeic and *p*-coumaric acids, cytotoxic effects were observed. Therefore, more studies using these two natural compounds should be conducted to understand their safety in non-tumor cells. Further studies with other methodologies, experimental parameters, or using other cancer cell lines should also be considered. Additionally, this work also highlights the importance of publishing negative results, since this data may be fundamental to redirect further studies.

cos em células de carcinoma do cólon (HT 29) e em células de carcinoma colorretal humano (HCT-15) (37). Contudo, embora existam alguns estudos concordantes com os nossos resultados, existem também alguns estudos *in vitro* que demonstraram que estes compostos diminuem não só a viabilidade e a proliferação celular bem como induzem a apoptose em várias linhas celulares tumorais (Tabela 1), utilizando um intervalo de concentrações semelhante ao do nosso trabalho experimental (38-42). Por exemplo, num estudo prévio, foi reportado que o ácido ferúlico, a concentrações até 100 μM, diminuiu a viabilidade das células MDA-MB-231 de cancro da mama (38). Adicionalmente, num outro estudo, usando a mesma linha celular e utilizando os ensaios do XTT, sulforodamina B e vermelho neutro, após um período de exposição de 24 ou 48 h ao ácido cafeico (10-100 μM), a viabilidade celular obtida diminuiu de forma dependente da concentração (39). Num outro estudo, utilizando o ensaio de redução do MTT, também foi observado que, o ácido cafeico (50-1000 μM; 24 h) causou efeitos antiproliferativos em células Caco-2 (40). Para além disto, outro trabalho revelou que o ácido *p*-cumárico (150 μM), diminuiu a viabilidade celular de células do neuroblastoma, sendo a diminuição mais significativa após 72 h de tratamento (41). Para além disto, Bouzaiene et al. (2015), também observaram que a exposição aos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico (50-1000 μM, 24 h, ensaio de redução do MTT) inibiu, de forma significativa e dependente da concentração, a proliferação de células tumorais do pulmão humano (A549) do cólon (HT29-D4) (42). Estas discrepâncias entre os diversos estudos podem estar relacionadas com as diferentes condições experimentais utilizadas, assim como com a diferença dos mecanismos celulares característicos de cada tipo de células. Estes estudos demonstram a importância de usar diferentes metodologias, modelos e condições experimentais, quando se pretende avaliar a possível aplicabilidade dos ácidos fenólicos como agentes antitumorais.

Conclusão

Neste estudo foi investigado a citotoxicidade dos ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico em linhas celulares renais tumorais humanas. Os nossos resultados revelaram que até 250 μM, nenhum dos compostos naturais estudados mostrou efeitos citotóxicos na linha celular 786-O, sob as nossas condições experimentais. Contudo, às concentrações mais elevadas, foram observados efeitos citotóxicos na presença dos ácidos cafeico e *p*-cumárico. Desta forma, mais estudos usando estes

dois compostos naturais devem ser realizados com o intuito de se perceber a sua segurança em células não-tumorais. Novos estudos com outras metodologias, parâmetros experimentais ou utilizando diferentes linhas celulares devem ser realizados. Adicionalmente, este estudo permitiu ainda salientar a importância de publicar resultados negativos, uma vez que estes resultados poderão contribuir para redirecionar estudos futuros.

Acknowledgments

This work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), through funding UID/DTP/04567/2019. Rita Caparica and Ana Júlio would like to acknowledge ALIES for the grant PADDIC 2018-2019.

Conflict of Interests

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

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

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), no âmbito do projeto UID/DTP/04567/2019. Rita Caparica e Ana Júlio gostariam ainda de agradecer à ALIES pela bolsa PADDIC 2018-2019.

Conflito de Interesses

O editor senior envolvido na autoria deste manuscrito não teve qualquer participação no processo de revisão ou de decisão.

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

References / Referências

1. Mathur S, Hoskins C. Drug development : Lessons from nature (Review). Biomed Reports. 2017;6(6):612–4.
2. Taofi O, González-Paramás AM, Barreiro MF, Ferreira ICFR. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives : Future Perspectives , a Review. molecules. 2017;22(2):1–24.
3. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects : An Overview. medicines. 2018;5(3):1–16.
4. Huang W, Cai Y, Zhang Y, Huang W, Cai Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants : Potential Use for Cancer Prevention. Nutr Cancer. 2010;62(1):1-20.
5. Heleno SA, Martins A, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review [Internet]. Vol. 173, Food Chemistry. 2015 [cited 2018 Sep 14]. p. 501–13. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016197
6. Vuolo MM, Lima VS, Roberto M, Junior M. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power [Internet]. Bioactive Compounds. Elsevier Inc.; 2019. 33–50 p. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5
7. Rosa LA de la, Moreno-escamilla JO, Rodrigo-garcía J, Alvarez-parrilla E. Phenolic Compounds [Internet]. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Elsevier Inc.; 2019. 253–272 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9
8. Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICF. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds : A review. Ind Crop Prod [Internet]. 2016;82:9–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016
9. Caparica R, Júlio A, Araújo MEM, Baby AR, Fonte P, Costa JG, et al. Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. Biomolecules. 2020;10(2):1–15.
10. Xu D, Hu M, Wang Y, Cui Y. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. Molecules. 2019;24(6):1–15.
11. Duan J, Yue W, E JY, Malhotra J, Lu S, Gu J, et al. In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation , apoptosis , and STAT3 and NF κ B signaling in pancreatic cancer cells. Nat Publ Gr [Internet]. 2016;(August):1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/srep31672
12. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M. Resveratrol : A Double-Edged Sword in Health Benefits. Biomedicines. 2018;6(3):1–20.
13. Kumar A, Manjula M. Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Mol Biol Rep. 2015;42(9):1407–17.
14. Jara P, Spies J, Cárcamo C, Arancibia Y, Vargas G, Martin C, et al. The Effect of Resveratrol on Cell Viability in the Burkitt's Lymphoma Cell Line Ramos. Molecules. 2017;23(1):1–12.
15. Caparica R, Júlio A, Baby AR, Araújo MEM, Fernandes AS, Costa JG, et al. Choline-Amino Acid Ionic Liquids as Green Functional Excipients to Enhance Drug Solubility. Pharmaceutics [Internet]. 2018;10(4):1–13. Available from: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040288
16. Rio D Del, Rodriguez-mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases 1. Antioxid Redox Signal. 2013;18(14).
17. Magnani C, Isaac V, Salgado H. Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. Anal Methods. 2014;(10):3203–10.
18. Serafim TL, Carvalho FS, Marques MPM, Calheiros R, Silva T, Garrido J, et al. Lipophilic Caffeic and Ferulic Acid Derivatives Presenting Cytotoxicity against Human Breast Cancer Cells. Chem Res Toxicol. 2011;763–74.
19. Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid : Pharmacological and toxicological aspects. FOOD Chem Toxicol [Internet]. 2014;65:185–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024
20. Kumar N, Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. Biotechnol Reports [Internet]. 2014;4:86–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002
21. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p -Coumaric acid and its conjugates : dietary sources , pharmacokinetic properties and biological activities. Sci Food Agric. 2016;
22. Joshua S, Vachana P, Prince E, Mahaboobkhan S. Ameliorative effect of p -coumaric acid , a common dietary phenol , on adjuvant-induced arthritis in rats. Rheumatol Int. 2013;325–34.
23. Yeh I-J, Chen S-C, Yen M-C, Wu Y-H, Hung C-H, Kuo P-L. 6-Shogaol Suppresses 2-Amino-1-Methyl-6- Phenylimidazo [4,5-b] Pyridine (PhIP)-Induced Human 786-O Renal Cell Carcinoma Osteoclastogenic Activity and Metastatic Potential. Nutrients. 2019;11(10):1–14.
24. Ou Y, Li J, Wang J, Chang C, Wu C, Chen W, et al. Fibronectin Promotes Cell Growth and Migration in Human Renal Cell Carcinoma Cells. Mol Sci. 2019;20(11):1–16.
25. Shao Y, Liu Z, Liu J, Wang H, Huang L, Lin T, et al. Expression and epigenetic regulatory mechanism of BNIP3 in clear cell renal cell carcinoma. Int J Oncol. 2019;54:348–60.
26. Lin CY, Chen P-N, Hsu L-S, Kuo DYK, Chu S-C, Hsieh Y-SH. Inhibition of the invasion and migration of renal carcinoma 786-o-si3 cells in vitro and in vivo by Koelreuteria formosana extract. Mol Med Rep. 2014;3334–42.
27. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Bex A, Khoo V, Gruenvald V, et al. Renal cell carcinoma : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up. Ann Oncol. 2016;27(August).
28. Júlio A, Caparica R, Lima SAC, Fernandes AS, Rosado C, Prazeres DMF, et al. Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. nanomaterials. 2019;9(8):1–17.
29. Santos de Almeida T, Júlio A, Saraiva N, Fernandes AS, Araújo MEM, Baby AR, et al. Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. Drug Dev Ind Pharm. 2017;43(11):1858–65.
30. Costa JG, Saraiva N, Guerreiro PS, Louro H, Silva MJ, Miranda JP, et al. Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: an integrative approach of complementary endpoints. Food Chem Toxicol [Internet]. 2015; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.018
31. Costa JG, Saraiva N, Batinic-Haberle I, Castro M, Oliveira NG, Fernandes AS. The SOD Mimic MnTnHex-2-PyP 5 + Reduces the Viability and Migration of 786-O Human Renal Cancer Cells. antioxidants. 2019;8(10):1–14.
32. Fernandes AS, Serejo J, Gaspar J, Cabral F, Bettencourt AF, Rueff J, et al. Oxidative injury in V79 Chinese hamster cells: Protective role of the superoxide dismutase mimetic MnTM-4-PyP. Cell Biol Toxicol. 2010;26(2):91–101.
33. Meerloo J Van, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols [Internet]. second. Springer Science+Business Media; 2011. p. 237–45. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5
34. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. PLoS One. 2016;11(5):1–17.
35. Konduri SD, Bangaru MLY, Do PT, Chen S, Woodliff J, Kansra S. In Vitro Growth Suppression of Renal Carcinoma Cells by Curcumin. J Patient-Centered Res Rev. 2015;2(4):156–64.
36. Nicolai M, Almeida N, Rijo P, Costa JG, Saraiva N, Fernandes AS. Cytotoxic effect of antioxidants found in food from plant origin on human osteosarcoma U2OS Cells. Biomed Biopharm Res. 2019;1(16):89–96.
37. Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of *p*-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. World J Gastroenterol. 2013;19(43).
38. Zhang X, Jiang R, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. Oncol Rep. 2016;271–8.
39. Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzebska-Stojko Z, Stojko R, Wojtyczka RD, et al. Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl. Nutrients. 2017;9(10):1–19.
40. Ekbatan SS, Li XQ, Ghorbani M, Azadi B, Kubow S. Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. Int J Mol Sci. 2018;19(3):1–13.
41. Shailasree S, Venkataramana M, Niranjana SR, Prakash HS. Cytotoxic Effect of p -Coumaric Acid on Neuroblastoma , N2a Cell via Generation of Reactive Oxygen Species Leading to Dysfunction of Mitochondria Inducing Apoptosis and Autophagy. Mol Neurobiol. 2014;1–12.
42. Bouzaiene NN, Kilani Jaziri S, Kovacic H, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Luis J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. Eur J Pharmacol [Internet]. 2015;766:99–105. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biomedical Sciences | *Ciências Biomédicas* *Biomed Biopharm Res.,* 2020; 17(1): 75-89

doi: 10.19277/bbr.17.1.230

Calendula officinalis L. inflorescences extract: *in vivo* evaluation of its gastric ulcer healing potential

Extrato de inflorescências de Calendula officinalis L.: avaliação in vivo do seu potencial como cicatrizante de úlcera gástrica

Luisa Mota da Silva [1], Ana Carolina Araújo [2], Viviane Silva Bunn [3], Luisa Nathalia Bolda Mariano [1], Lincon Bordignon Somensi [1], Thaise Boeing [1], Luiz Carlos Klein Jr. [1], Sérgio Faloni de Andrade [1,4*]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Núcleo de Investigacões Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Centro, 88302-202 Itajaí, SC, Brazil; [2]Graduação em Nutrição, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Campus Itajaí, Santa Catarina, Rua Uruguai, 458, Centro, CEP: 88302-901, Brazil; [3]Graduação em Biomedicina, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Campus Itajaí, Santa Catarina, Rua Uruguai, 458, Centro, CEP: 88302-901, Brazil; [4]Universidade Lusófona - CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

*Corresponding author: sergio.andrade@ulusofona.pt

Abstract

Calendula officinalis L. (Asteraceae), popularly known as Marigold in Europe and "Calêndula" in Brazil is a medicinal plant used for centuries to treat a wide variety of ailments including gastric ulcers. Despite its folk use, there are few studies about the potential of *C. officinalis* extract to heal gastric ulcers. In this study, gastric ulcer healing potential of *C. officinalis* inflorescences (HECO) was evaluated using chronic gastric ulcer induced by acetic acid in Wistar rats. Different groups (n=6) were treated orally with vehicle (water plus 0.5% Tween 80, 1 mL/100 g), omeprazole (20 mg/kg), or HECO (10, 30 and 100 mg/kg), twice a day for seven days. The results showed that HECO is rich in phenolic substances and displays healing chronic gastric ulcer activity, evidenced by diminished lesion area. Additionally, the data suggest that its effectiveness is related, at least in part, to the capacity of extract to increase production of protective factors of gastric mucosa, such as mucus and antioxidants, and to increase collagen synthesis. This study contributes to the validation of the folk use of the extract of *C. officinalis* inflorescences for the treatment of gastric ulcer.

Keywords: gastric ulcer; Calendula; ulcer healing; marigold

Resumo

Calendula officinalis L. (Asteraceae), popularmente conhecida como Marigold na Europa e Calêndula no Brasil, é uma planta medicinal usada para tratar várias doenças, incluindo úlceras gástricas. Porém, há poucos estudos sobre o potencial do extrato de *C. officinalis* na cicatrização de úlceras gástricas. Neste estudo, o potencial de cicatrização de úlceras gástricas das inflorescências de *C. officinalis* (HECO) foi avaliado usando úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético em ratos Wistar. Diferentes grupos (n = 6) foram tratados oralmente com veículo (solução 0,5% de Tween 80, 1mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg) ou HECO (10, 30 e 100 mg / kg), duas vezes ao dia, durante sete dias. Os resultados mostraram que o HECO é rico em substâncias fenólicas e apresenta atividade cicatrizante de úlcera gástrica crônica, evidenciada pela diminuição na área da lesão. Além disso, os dados sugerem que a eficácia está relacionada, pelo menos em parte, à capacidade do extrato em aumentar fatores protetores da mucosa gástrica, como muco e fatores antioxidantes, além de aumentar a síntese de colágeno. Este estudo contribui para a validação do uso popular do extrato de inflorescências de *C. officinalis* para o tratamento de úlcera gástrica.

Palavras-chave: úlcera gástrica; Calêndula; cicatrização de úlceras; marigold

Received / *Recebido*: 10/04/2020
Accepted / *Aceite*: 09/05/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Calendula officinalis L. (Asteraceae), popularly known as Marigold in Europe and "Calêndula" in Brazil, is a medicinal plant widely grown in the world. Its inflorescences have been used for centuries to treat a wide variety of ailments including skin diseases, wounds, burn and gastrointestinal ulcers (1,2). When the terms "calendula tea and gastric ulcer" were used in a recent (March 2020) web search, the results included more than 230,000 references regarding recommendations and methods of preparations (tea infusion) based on *Calendula officinalis* inflorescences to treat gastric ulcers. The plant is listed in the following compendiums: German Commission E Monographs,European Scientific Cooperative on Phytotherapy, British Herbal Pharmacopeia, the World Health Organization monographs, and the Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Brazilian Pharmacopeia) for wound healing and anti-inflammatory actions (3, 4).

Despite widespread folk use to treat gastrointestinal ulcers, there are few studies about the potential of *Calendula officinalis* extract to heal gastric ulcers. Therefore, this study aims to help fill this scientific gap (5). In the literature, there are previous studies concerning its gastroprotection effect in acute ulcer models (gastroprotective models) (1,6), but an extract or compound found to have a gastroprotective effect does not always ensure it also has healing properties. Therefore, established or potential antiulcer agents should also be evaluated using of a chronic ulcer model (healing model).

Gastric ulcer is a chronic disease that affects millions of people all the world and is characterized by the presence of a deep necrotic lesion involving the entire stomach mucosal thickness, reaching the muscular mucosa (7). Currently, therapy is primarily based on acid gastric suppression, using Proton Pump Inhibitors (PPIs) and type-2 histamine receptor antagonists (H2RAs), such as omeprazole and cimetidine (respectively). However, in recent years, several studies have related antisecretory drugs with serious adverse effects, for example, headache, dyspepsia, diarrhea, atrophic gastritis (a precursor for gastric cancer), increased *Clostridium difficile* colitis, decreased calcium absorption and increased risk of osteoporotic fractures, pneumonia, and thrombocytopenia, among others (8,9). Thus, the current search for safer and more effective antiulcer treatments is mandatory, and the approach of using plants and folk medicine has been shown to be promising in this sense.

Hence, the aim of the work is to assess the gastric ulcer healing potential of the hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* inflorescences in a preclinical acetic

Introdução

Calendula officinalis L. (Asteraceae), popularmente conhecida como "Marigold" na Europa e Calêndula no Brasil, é uma planta medicinal amplamente distribuída no mundo. Suas inflorescências são usadas há séculos para tratar uma grande variedade de doenças, incluindo doenças de pele, feridas, queimaduras e úlceras gastrointestinais (1,2). Quando são usados os termos "chá de calêndula e úlcera gástrica" foram usados em uma busca recente (março de 2020) em um site de pesquisa, os resultados retornam mais de 230.000 referências sobre recomendações e métodos de preparações (infusão de chá) com base nas inflorescências de *Calendula officinalis* para tratar úlceras gástricas. A planta está listada como tendo propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias nos seguintes compêndios:monografias da Comissão E Alemã, Cooperativa Científica Europeia de Fitoterapia (ESCOP), Farmacopeia Britânica de Ervas, monografias da Organização Mundial da Saúde e Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (3, 4).

Apesar do amplo uso na medicina popular para tratar úlceras gastrointestinais, há poucos estudos sobre o potencial do extrato de *Calendula officinalis* para cicatrização de úlceras gástricas. Portanto, este estudo tem como objetivo ajudar a preencher essa lacuna científica (5). Na literatura, existem estudos anteriores sobre o efeito gastroprotetor em modelos de úlcera aguda (modelos gastroprotetores) (1,6), mas o fato de um extrato ou composto ter efeito gastroprotetor nem sempre garante propriedades curativas, portanto, agentes antiulcerosos estabelecidos ou potenciais também devem ser avaliados usando um modelo de úlcera crônica (modelo de cicatrização).

A úlcera gástrica é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e é caracterizada pela presença de uma lesão necrótica profunda envolvendo toda as camadas da mucosa do estômago, atingindo inclusive a camada muscular da mucosa (7). Atualmente, a farmacoterapia da úlcera gástrica é baseada principalmente na supressão da secreção de ácido gástrico, usando inibidores da bomba de prótons (IBP) e antagonistas do receptor de histamina tipo 2 (H2-RAs), como omeprazol e cimetidina. No entanto, nos últimos anos, vários estudos relacionaram medicamentos antissecretores com sérios efeitos adversos, como por exemplo: dor de cabeça, dispepsia, diarreia, gastrite atrófica - precursora do câncer gástrico -, aumento da colite por *Clostridium difficile*, diminuição da absorção de cálcio e aumento do risco de fraturas osteoporóticas, pneumonia, trombocitopenia, entre outros (8,9). Deste modo, atualmente

acid-induced chronic ulcer model in order to fill this gap and collaborate to confirm the folk medicine indications, contributing to open the way for other studies which could to allow the development of phytomedicines to treat gastric ulcer from this plant.

Materials and Methods

Chemicals

Omeprazole, TRIS-HCl, 5,5 'dithiobis-2-nitrobenzoic acid, bovine serum albumin, GSH and rutin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Ethanol, acetonitrile, acetic acid, formic acid and trichloroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Xylazine and ketamine were purchased from Syntec (Santana de Parnaiba, SP, Brazil). Bradford reagent was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Botanical material and extract preparation

Dry *Calendula officinalis* inflorescences (200 g.) were purchased from the Natural Products House in Itajaí City, Brazil in May 2016 and identified by comparison with voucher specimen and description reported in compendium "Virtual Herbarium" (available in http://inct.splink.org.br/) by agronomist Renê Artur Ferreira. The inflorescences were reduced to small pieces using knife mill (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) and macerated in a hydroalcoholic solution (70% ethanol/ 30% water) for seven days. After maceration, the solution was filtered and the solvent was removed using a rotatory evaporator. Next, the extract was dried in an airstream at 45 ^{o}C using a circulating hot air oven. The final humidity in the extract was measured by loss on drying methodology as described in Brazilian Pharmacopoeia (10), and the result showed that its humidity was 5%. The yield was 15.6 g (yield: 7.85%) of the hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* inflorescences (HECO).

a busca por medicamentos anti-úlcera gástrica, mais seguros e eficazes, é de grande importância e as plantas medicinais tem se mostrado promissoras nesse sentido. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial cicatrizante de úlceras gástricas do extrato hidroalcoólico de inflorescências de *Calendula officinalis* em modelo de úlcera crônica experimental induzida por ácido acético, a fim de preencher essa lacuna e colaborar para confirmar a indicação popular, contribuindo de forma a abrir caminho para outros estudos que permitam o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico para tratar úlcera gástrica a partir desta planta.

Material e Métodos

Reagentes

Omeprazol, TRIS-HCl, ácido 5,5 'ditiobis-2-nitrobenzóico, albumina sérica bovina, GSH e rutina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Etanol, acetonitrila, ácido acético, ácido fórmico e ácido tricloroacético foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Xilazina e cetamina foram adquiridas da Syntec (Santana de Parnaíba, SP, Brasil). O reagente de Bradford foi adquirido da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

Obtenção do material vegetal e extrato

As inflorescências secas de *Calendula officinalis* (200 g.) foram compradas em Casa de Produtos Naturais na cidade de Itajaí, Brasil, em maio de 2016. A identificação botânica foi realizada por comparação com espécime depositada e autenticada, bem como sua descrição relatada no compêndio "Herbário Virtual" (disponível em http: //inct.splink .org.br/) pelo engenheiro agrônomo Renê Artur Ferreira. As inflorescências foram reduzidas a pequenos pedaços usando moinho de facas (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e maceradas em solução hidroalcoólica (70% de etanol/30% de água), por sete dias. Após a maceração, a solução foi filtrada e o solvente foi removido por um evaporador rotativo. Em seguida, o extrato foi seco em uma corrente de ar a 45 ^{o}C, utilizando uma estufa de ar seco circulante. A umidade final no extrato foi mensurada pela metodologia de perda por dessecação, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (10), e o resultado mostrou que a umidade foi de 5%. O rendimento final foi de 15,6 g (rendimento: 7,85%) do extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Calendula officinalis* (HECO).

Phytochemical analysis

Samples HECO and rutin, an abundant substance in *C. officinallis* used as phytochemical marker (10) were freshly prepared in a mixture of water/acetonitrile (1:1, v/v) by sonication. Both were filtered through a cellulose regenerated membrane filter (0.22 µm). For the chromatographic analysis, an ACQUITY UPLC I-class system was used, with an ACQUITY UPLC BEH C18 column (50 mm x 2.1 mm i.d. 1.7µm) (both Waters, Milford, MA, USA) at 35 °C for substance separation. The mobile phase consisted of water (formic acid 0.1%) (A) and acetonitrile (B), in a gradient from 95:5 (A:B, v/v; 0 min) to 0:100 (v/v; 11 min) with a flow rate of 0.3 mL/min. A 2 µL aliquot of each sample was injected, with detection at 354 nm.

To establish a calibration curve for the determination of its concentration in the HECO, rutin was injected in five concentrations (0.1-100 µg/mL). Samples were prepared in triplicate and injected in duplicate. The areas were plotted against the corresponding concentration, and linearity was determined by linear regression analysis using Microsoft Excel 15.0® (Microsoft, Redman WA, USA). The HECO extract solution (1 mg/mL), for determination, was prepared in triplicate and injected in duplicate.

UHPLC-QToF analysis

For chromatographic separation, a Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used. The same conditions as described in the previous (Phytochemical analysis) section were applied.. MS analysis was performed on an impact II QTOF system (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), over a 50-1000 m/z range. Capillary voltage was set at 4000 V, end plate offset voltage at 500 V, nebulizer pressure at 4 Bar and dry gas temperature at 200 °C.

Animals

Male Wistar rats (180-200 g) were supplied by Central Animal Laboratory of the University of Vale do Itajaí (UNIVALI). The animals were kept in polypropylene cages at 22 ± 2 °C under 12 h light/dark cycle during five days (acclimatization period) with access to food and water ad libitum until eight hours prior to the experiments.. All protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA/UNIVALI; approval number 02 / 2015p) and were carried out in accordance with the International Standards and the Ethical Guidelines on Animal Welfare (NRC, 1996 and CCAC, 1993).

Análise fitoquímica

As amostras HECO e rutina (uma substância abundante em *C. officinallis* usada como marcador fitoquímico (10) foram preparadas em uma mistura de água/acetonitrila (1: 1, v/v) e dissolvidas usando ultrassom. Após, ambas foram filtradas com membrana regenerada de celulose (0,22 µm). Para a análise cromatográfica, foi utilizado equipamento UPLC ACQUITY I, e foi utilizada uma coluna C18 UPLC ACQUITY BEH (50 mm x 2,1 mm i.d. 1,7 µm) (ambos Waters, Milford, MA, EUA) a 35 ° C para a separação das substâncias. A fase móvel consistiu em água (ácido fórmico a 0,1%) (A) e acetonitrila (B), em um gradiente de 95: 5 (A: B, v/v; 0 min) a 0: 100 (v/v; 11 min) com uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi injetada, com detecção a 354 nm.

Para determinação da rutina no HECO uma curva linear foi construída, a partir da injeção do analito em cinco concentrações (0,1-100 µg/mL). As amostras foram preparadas em triplicata e injetadas em duplicata. As áreas foram plotadas de acordo com a concentração correspondente, e a linearidade foi determinada por análise de regressão linear usando Microsoft Excel 15.0® (Redmond, WA, USA). A solução do extrato (1 mg/mL), para determinação, foi preparada em triplicata e injetada em duplicata.

Análise por UHPLC-QToF

Para análise UHPLC-QToF, foi utilizado um equipamento Shimadzu Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japan). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas acima, na seção Análise Fitoquímica. A análise de MS foi realizada em um analisador Impact II Bruker QToF, na faixa de m/z 50-1000. A tensão capilar foi ajustada em 4000 V, a tensão de compensação da placa final em 500 V, a pressão do nebulizador em 4 Bar e a temperatura do gás seco em 200 °C.

Animais

Ratos Wistar machos (180-200 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a 22 ± 2 °C sob ciclo de 12 horas claro/escuro durante cinco dias (período de aclimatação) com acesso a comida e água ad libitum até oito horas antes dos experimentos.. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética de uso de Animais (CEUA / UNIVALI; número de aprovação 02/2015p) e foram realizados de acordo com as Normas Internacionais e Diretrizes Éticas sobre Bem-Estar Animal (NRC, 1996 e CCAC, 1993).

Chronic gastric ulcer induced by acetic acid in rats

After eight hours fasting, 30 rats were anesthetized with xylazine and ketamine (10 mg/kg and 5 mg/kg, i.p.), and a midline laparotomy was performed to expose the stomach and allow the application of 500 µL of 80% acetic acid onto the serosa using a plastic tube(6 mm). The contact between acetic acid and mucosa lasted 1 min, and after this time the acid was aspirated, the serosa was washed with saline, the stomach was put back on the abdominal cavity, and the incision was sutured as described by Okabe et al. (11). Two days after surgical recovery the rats were randomly divided into different groups (n=6), and orally treated with vehicle (water plus 0.5% Tween 80, 1 mL/100 g), omeprazole (20 mg/kg), or HECO (10, 30 and 100 mg/kg), twice a day for seven days. On Day 8 of the treatment period, the animals were euthanized, the stomach removed and opened along the greater curvature and the gastric ulcer area in the mucosa was measured using a graduated scale. Next, a lesion site fragment was immediately fixed with a 10% neutral buffered formalin for histological and histochemical analysis and the remaining tissue used for quantification of reduced glutathione (GSH) levels.

Histological and histochemical analyses

For histological and histochemical analyses, one fragment of the gastric ulcer from each animal was fixed in 10% neutral buffered formalin followed by embedding in paraffin, and 7 µm sections were cut and prepared in slides. After deparaffinization, a portion of histological sections were stained by the classical hematoxylin and eosin method. Another portion of the deparaffinized segments was used in the histochemical analysis to measure gastric mucin using the Schiff's Periodic Acid (PAS), and collagen by Masson's trichrome staining (12). ImageJ software was used to assess the content of gastric mucin and collagen.

Quantification of GSH levels

Quantification of GSH levels was carried out as described by Sedlak et al. (13). First, the ulcerated tissue fragments were homogenized using a tissue homogenizer (IKA T 10 UltraTurrax®, Wilmington, DE, USA) at 25,0000 rpm in order to lyse the cells. This process was undertaken under ice using phosphate buffer 200 mM (pH 6.5) at a ratio 3:1 of buffer: sample. Afterward, the samples were stored frozen at -80 °C until GSH quantification, when they were thawed. Prior to GSH quantification, the protein concentration was measured using 5 µL of sample and 200 µL of Bradford reagent. Bovine serum albumin (0.01 - 0.10

Úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético em ratos

Após oito horas em jejum, 30 ratos foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg, i.p.) e uma laparotomia na linha média foi realizada para expor o estômago e permitir a aplicação de 500 µL de ácido acético a 80% na serosa usando um tubo de plástico (6 mm). O contato entre o ácido acético e a mucosa durou 1 minuto e, após esse período, o ácido foi aspirado, a serosa foi lavada com solução salina, o estômago foi recolocado na cavidade abdominal e a incisão foi suturada conforme descrito por Okabe et al. (11). Dois dias após a recuperação cirúrgica, os ratos foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos (n = 6) e tratados oralmente com veículo (água mais 0,5% Tween 80, 1 mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg) ou HECO (10, 30 e 100 mg/kg), duas vezes ao dia por sete dias. No oitavo dia do período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, o estômago removido e aberto ao longo da curvatura maior e a área da úlcera gástrica na mucosa foi medida usando uma escala graduada. Em seguida, um fragmento do local da lesão foi imediatamente fixado com formalina tamponada neutra a 10% para análise histológica e histoquímica, e o restante foi utilizado para quantificação dos níveis reduzidos de glutationa (GSH).

Análises histológicas e histoquímicas

Para análises histológicas e histoquímicas, um fragmento da úlcera gástrica de cada animal foi fixado em formalina tamponada neutra a 10%, após incorporação em parafina e cortes de 7 µm foram executados e montados em lâminas de microscopia. Após desparafinização, parte dos segmentos histológicos foi corada pelo método clássico de hematoxilina e eosina para observar o processo de cicatrização microscopicamente. Outra porção dos segmentos desparafinizados foi usada na análise histoquímica para medir a mucina gástrica usando o Ácido Periódico de Schiff (PAS) e o colágeno pela coloração tricromática de Masson (12). Para avaliar o conteúdo de mucina e colágeno gástrico foi utilizado o software ImageJ.

Quantificação dos níveis de GSH

A quantificação dos níveis de GSH foi realizada como descrito por Sedlak et al. (13). Primeiramente, os fragmentos de tecido ulcerado foram homogeneizados usando um homogeneizador de tecidos (IKA T 10 UltraTurrax®,Wilmington, DE, USA) a 25.0000 rpm, a fim de lisar as células. Este processo foi realizado sob gelo usando tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) na taxa de 3:1 de tampão:amostra. Além disso, as amostras

μg/mL) was used to obtain a standard curve. Afterward, the homogenate was deproteinized using 12.5% trichloroacetic acid and the material resultant was centrifuged at 900 × g, 20 min, at 4 °C. Next, 10 μL of the supernatant was added to 290 μL of 0.4 M TRIS-HCl buffer (pH 8.9) and the reaction initiated by the addition of 5 μL of 1 mM 5,5 'dithiobis-2-nitrobenzoic acid. The absorbance was read after 5 min at 415 nm and the individual values were interpolated on a standard curve of GSH (1.25 – 10.0 μg/mL). Results are expressed in μg/g of tissue. In quantification of GSH, a group of control (non-intervened, n=6) animals was included with the experiment to allow comparison of the normal levels in animals without any acid treatment.

Statistical analysis

The data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM) and were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test using GraphPad Prism 5® software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A p value <0.05 was considered significant in all experiments.

Results and Discussion

Phenolic substances are widely described for *Calendula* species, including flavonoids and hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid derivatives (14). To this end, the hydroalcoholic extract of *C. officinalis* was analyzed by UPLC-MS/MS in order to give additional information focusing on phenolic substances based on their chemical composition. Using MS-fragmentation data, it was possible to elucidate the structure of five flavonols and two hydroxycinnamic acid derivatives (Figure 1).

Both flavonols-O-glycosides and flavonols aglycones were detected in the extract of *C. officionalis*. Two of them exhibited an ion at m/z 301, characterizing quercetin [quercetin-H]{1}, as well as a quercetin derivative. The sugar moiety linked to the quercetin derivative was assigned as 3-O-rutinoside (Rha-1→Glc-6) since the abundance of the cleavage of the glycosidic link was higher than of quercetin itself (15). This confirmed the presence of quercetin-3-O-rutinoside (rutin {2}). The identification was confirmed by the co-injection of quercetin and rutin standards.

Substances {3} and {4} were identified as isorhamnetin and as isorhamnetin-3-O-glucoside. For {3}, a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 315 was assigned to [isorhamnetin-H]-. For {4}, a base peak $[M-H\text{-glucoside}]^-$ at m/z 315 with a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 477 indicated the loss of 162 Da, corroborating with a 3-O-glucoside derivative of isorhamentin (16).

foram mantidas em congelamento a -80 ºC até a quantificação do GSH, quando foram descongeladas. Antes da quantificação do GSH, a concentração de proteína foi medida usando 5 μL de amostras e 200 μL de reagente de Bradford. A albumina sérica bovina (0,01 - 0,10 μg/mL) foi utilizada para obter uma curva padrão. Após, o homogenato foi desproteinizado usando 12,5% de ácido tricloroacético e o material resultante foi centrifugado a 900×g, 20 min, a 4 °C. Em seguida, 10 μL do sobrenadante foi misturado com 290 μL de tampão TRIS-HCl 0,4 M (pH 8,9) e a reação foi iniciada pela adição de 5 μL do ácido 5,5 'ditiobis-2-nitrobenzóico 1 mM. A absorbância foi lida após 5 min a 415 nm e os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH (1,25 - 10,00 μg/mL). Os resultados foram expressos em μg/g de tecido. Na quantificação do GSH, um grupo naive (n=6) foi inserido no experimento para permitir a comparação dos níveis normais em animais sem nenhum tratamento.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e foram comparados pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni usando o software GraphPadPrism 5® (software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um valor de p <0,05 foi considerado significativo em todos os experimentos.

Resultados e Discussão

As substâncias fenólicas são amplamente descritas para as espécies de *Calendula*, incluindo flavonóides e derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (14). Nesse sentido, o extrato hidroalcoólico de *C. officinalis* foi analisado por UPLC-MS/ MS, a fim de fornecer informações adicionais com foco em substâncias fenólicas devido à sua composição química. Utilizando dados de fragmentação de MS, foi possível elucidar a estrutura de cinco flavonóis e dois derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 1).

Flavonóis-O-glicosídeos e flavonóis agliconas foram detectados no extrato de *C. officionalis* e dois deles exibiram um íon em m/z 301, caracterizando a quercetina [quercetina-H] {1}, bem como um derivado da quercetina. A fração de açúcar ligada ao derivado de quercetina foi atribuída como 3-O-rutinosídeo (Rha-1→Glc-6), uma vez que a abundância da clivagem do elo glicosídico era maior do que a própria quercetina (15). Isso confirmou a presença de quercetina-3-O-rutinósido (rutina {2}). A identificação foi corroborada pela co-injeção de padrões das substâncias quercetina e rutina.

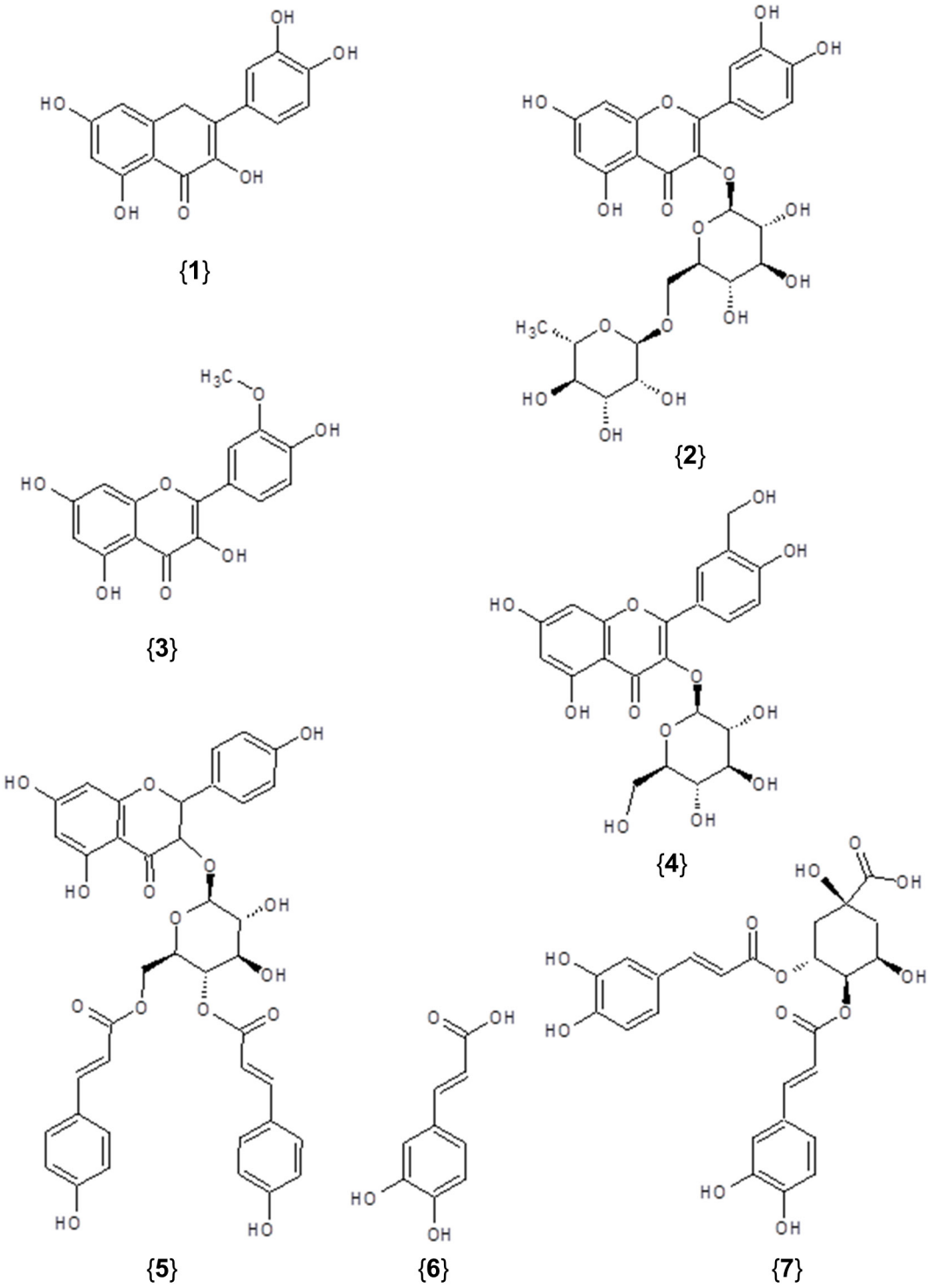


Figure 1 - Majority substances identified in hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* inflorescences (HECO). {1} quercetin; {2} quercetin-3-O-rutinoside (rutin); {3} isorhamnetin; {4} isorhamnetin-3-O-glucoside; {5} kaempferol-3-O-(6-p-coumaroyl) glucoside; {6} caffeic acid; {7} 3,4-O-dicaffeoylquinic acid

Figura 1 - Substâncias majoritárias identificados no extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Calendula officinalis* (HECO). {1}quercetina; {2} quercetina-3-O-rutinósido (rutina); {3) isorhamnetina; {4} isoramnetina-3-O-glucósido; {5} kaempferol-3-O- (6-p-coumaroil) glucósido; {6} ácido cafeico;{7} ácido 3,4-O-dicafeoilquinóico

Finally, for compound {5}, MS2 fragments at m/z 447 and at m/z 285 were in assigned as $[M-H-p\text{-}coumaroyl]^-$ and as $[M-H\text{-}coumaroylglucoside]^-$. Because of the pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 593, flavonol 5 is suggested to be kaempferol-3-O-(6-p-coumaroyl) glucoside (17). For the hydroxycinnamic acid derivatives, compound 6 was identified as caffeic acid, based both on MS2 fragmentation pattern and retention time. Compound 7 demonstrated a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 515, with fragment ions at m/z 355 and m/z 173, suggesting its identification as 3,4-¬O-dicaffeoylquinic acid (18). Taking into account that rutin {2} was one of the most abundant flavonols in HECO, its concentration was determined. The calibration curve was demonstrated as linear on the evaluated range (R^2=0.9995) and the marker content was estimated as 4.02 ± 0.12 mg/g. Previous studies reported lower content of rutin (19); however, there is no standardization for rutin content in *C. officinalis* (20).

There are several polyphenols, including flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives, which display an interesting potential for treatment and prevention of gastric ulcers (21,22). Thus, considering the chemical profile of HECO and considering its ethnopharmacology its potential to healing gastric ulcers has been undertaken in vivo using acetic acid-induced chronic gastric ulcer model. The acetic acid-induced gastric ulcers model is known also as the "kissing ulcer" because acetic acid is put in contact with gastric mucosa for some seconds to produce an ulcerative lesion on both the anterior and posterior walls (23). This model has been largely used in order to investigate the preclinical potential of antiulcer drugs as it satisfactorily mimics the morphology and pathology of the ulcerative process in humans (24).

The results showed that treatment with HECO (10, 30 and 100 mg/kg, per os) twice a day for seven days, reduced the 80% acetic acid-induced ulcer area by 18.9%, 57.2%, and 73.8%, respectively. However, the reduction was statistically significant only in groups treated with 30 mg/kg (*$p < 0.05$) and 100 mg/kg (**$p < 0.01$) when compared to the vehicle group (127.90 ± 12.04 mm^2). In the positive control group, the administration of omeprazole (20 mg/kg, per os), a Proton Pump Inhibitor used as standard drug in ulcer treatment, reduced the ulcerated area by 54.1% (*$p < 0.05$) (Figure 2, panel A). The histological appearance of the hematoxylin/eosin-stained ulcerated tissue showed, as expected, that the extension of the ulcer base (B) is larger and associated to deep damage into mucosa and submucosa in the vehicle group. On the other hand, the treatment with omeprazole (20 mg/

As substâncias {3} e {4} foram identificados como isorhamnetina e como isorhamnetina-3-O-glucósido. Para {3}, um íon pseudomolecular $[M-H]^-$ em m/z 315 foi atribuído a $[isorhamnetina\text{-}H]^-$. Para {4}, um pico base $[MH\text{-}glucosídeo]^-$ em m / z 315 com um íon pseudomolecular $[MH]^-$ em m/z 477 indicou a perda de 162 Da, corroborando com um derivado de 3-O-glucósido da isorrehamentina (16). Finalmente, para o composto {5}, os fragmentos de MS2 a m/z 447 e a m/z 285 foram designados como $[M-H\text{-}p\text{-}coumaroil]^-$ e como $[M-H\text{-}coumaroilglucosídeo]^-$. Por causa de um íon pseudomolecular $[M-H]^-$ em m/z 593, é possível sugerir que o flavonol 5 é o kaempferol-3-O-(6-p-coumaroil) glucosídeo (17). Para os derivados do ácido hidroxicinâmico, o composto 6 foi identificado, com base no padrão de fragmentação de MS2, bem como no tempo de retenção, como ácido cafeico. O composto 7 demonstrou um íon pseudomolecular $[M-H]^-$ em m/z 515, com íons fragmentos em m/z 355 e m/z 173, sugerindo sua identificação como ácido 3,4-OO-dicafeoilquinóico (18). Considerando que a rutina {2} era um dos flavonóis mais abundantes na HECO, seu conteúdo foi determinado. A curva de calibração foi demonstrada como linear na faixa avaliada (R^2 = 0,9995) e o conteúdo do marcador foi estimado em 4,02 ± 0,12 mg/g. Estudos prévios relatam um teor de rutina menor (19); porém, não há padronização para o teor de rutina em *C. officinalis* (20).

Existem vários polifenóis, como os flavonóides e derivados do ácido hidroxicinâmico, que apresentam um interessante potencial para o tratamento e prevenção de úlceras gástricas (21,22). Assim, considerando o perfil químico do HECO e, também a etnofarmacologia, seu potencial para cicatrização de úlceras gástricas foi realizado in vivo usando o modelo de úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético. O modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético é conhecido também como "úlcera de beijo", porque o ácido acético é colocado em contato com a mucosa gástrica por alguns segundos e produz uma lesão ulcerativa nas paredes anterior e posterior (23). Esse modelo tem sido amplamente utilizado para investigar o potencial pré-clínico dos medicamentos antiulcerosos, pois imita satisfatoriamente a morfologia e a patologia do processo ulcerativo em humanos (24).

Os resultados mostraram que o tratamento com HECO (10, 30 e 100 mg / kg, p.o) duas vezes ao dia por sete dias, reduziu a área da úlcera induzida por ácido acético a 80% em 18,9%, 57,2% e 73,8%, respectivamente. No entanto, houve redução significativa apenas nos grupos tratados com 30 mg/kg (* $p <0,05$) e 100 mg/kg (** $p <0,01$), quando comparado ao grupo veículo (127,90

kg) or HECO (100 mg/kg) provided an ulcer with a smaller base and partial regeneration of the margin (M) indicating acceleration of the healing process (Figure 2, panel B).

To explore the mode of action of HECO in the healing process, histochemical analysis for mucins and collagen were conducted, as well as quantification of glutathione reduced (GSH) in the ulcerative site. Mucins and collagen have been analyzed in histological cuts stained by Schiff's Periodic Acid (PAS) and Masson's trichrome, respectively.

The analysis of histological cuts stained with Schiff's Periodic Acid and Masson's trichrome showed a statistically significant increase of the mucins and collagen fibers in ulcer site in HECO 100 mg/kg and positive control groups when compared with negative control (Figure 3). In Schiff's Periodic Acid staining, the mucins are highlighted in rose color. Masson's trichrome staining normally is used to assess type I collagen, which is highlighted in blue (25). This collagen type is the most abundant in the gastric stroma (26).

The gastric mucosal barrier is an interesting example of natural engineering. This structure is responsible for avoiding self-digestion of the stomach wall by the highly corrosive juice which it secretes (27). One of its main constituents is mucus, which contains specialized O-glycoproteins called mucins (28). The genesis of acetic acid-induced gastric lesions starts mainly with the depletion of gastric wall mucus (29). Additionally, it has been demonstrated that collagen synthesis of the gastric mucosa has a key role in the gastric ulcer healing process. Collagen synthesis is not only triggered in the submucosa, but also in deeper layers, such as the muscularis propria and serosa, indicating the coordinated interaction of all structural layers of the gastric wall during the gastric ulcer healing process (26,30). Thus, the increase of mucins and collagen fibers provoked by the administration of HECO can be related to its healing gastric ulcer activity.

After mucus depletion, a significant increase in the production of free radicals also occurs, causing damage to the cell and cellular membrane due to excessive oxidative stress (31). In physiologic conditions, high GSH concentrations are found in the gastric mucosa. Considering the potent antioxidant effect of GSH and that it is a substrate for antioxidant enzymes, its presence is important to protect the mucosal from oxidative stress (32,33). A strong relationship between diminishing GSH levels and an increase in levels of ulcer severity has been reported (34). Therefore, GSH levels were quantified. The results displayed that there was a significant increase in the GSH levels in ulcer sites from

± 12,04 mm^2). No grupo controle positivo, a administração de omeprazol (20 mg/kg, po),inibidor da bomba de prótons usado como medicamento padrão no tratamento da úlcera, reduziu a área ulcerada em 54,1% (* p <0,05) (Figura 2, painel A). A aparência histológica do tecido ulcerado corado com hematoxilina/eosina mostrou, como esperado, que a extensão da base da úlcera (B) foi maior e associada a danos profundos na mucosa e submucosa no grupo veículo. Por outro lado, o tratamento com omeprazol (20 mg/kg) ou HECO (100 mg/kg) proporcionou uma úlcera com menor base e regeneração parcial da margem (M), indicando aceleração do processo de cicatrização (Figura 2, painel B).

Para explorar o modo de ação do HECO no processo de cicatrização, foram realizadas análises histoquímicas de mucinas e colágeno, bem como quantificação da glutationa reduzida (GSH) no sítio ulcerativo. Mucinas e colágeno foram analisados em cortes histológicos corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e pelo tricrômico de Masson, respectivamente.

A análise dos cortes histológicos, corados com o ácido periódico de Schiff e o tricrômico de Masson, mostrou um aumento estatisticamente significativo das mucinas e fibras de colágeno no local da úlcera nos grupos HECO 100 mg/kg e controle positivo, quando comparado ao controle negativo (Figura 3). Na coloração com ácido periódico de Schiff, as mucinas são destacadas na cor rosa. A coloração tricrômica de Masson normalmente é usada para avaliar o colágeno tipo I, destacando-o de cor azul (25). O colágeno tipo I é o mais abundante no estroma gástrico (26).

A barreira da mucosa gástrica é um exemplo interessante de engenharia natural. Essa estrutura é responsável por evitar que a própria parede do estômago seja digerida pela secreção (suco gástrico) altamente corrosiva que esta secreta (27). Um de seus principais constituintes é o muco, que contém O-glicoproteínas especializadas, chamadas mucinas (28). A gênese das lesões gástricas induzidas pelo ácido acético começa principalmente com a depleção do muco da parede gástrica (29). Além disso, foi demonstrado que a síntese de colágeno da mucosa gástrica tem um papel fundamental no processo de cicatrização da úlcera gástrica. A síntese de colágeno não é desencadeada apenas na submucosa, mas também em camadas mais profundas, como a "muscularis propria" e a serosa, indicando a interação coordenada de todas as camadas estruturais da parede gástrica durante o processo de cicatrização da úlcera gástrica (26,30). Assim, o aumento de mucinas e fibras colágenas provocadas pela administração de HECO pode estar relacionado à sua atividade cicatrizante da úlcera gástrica.

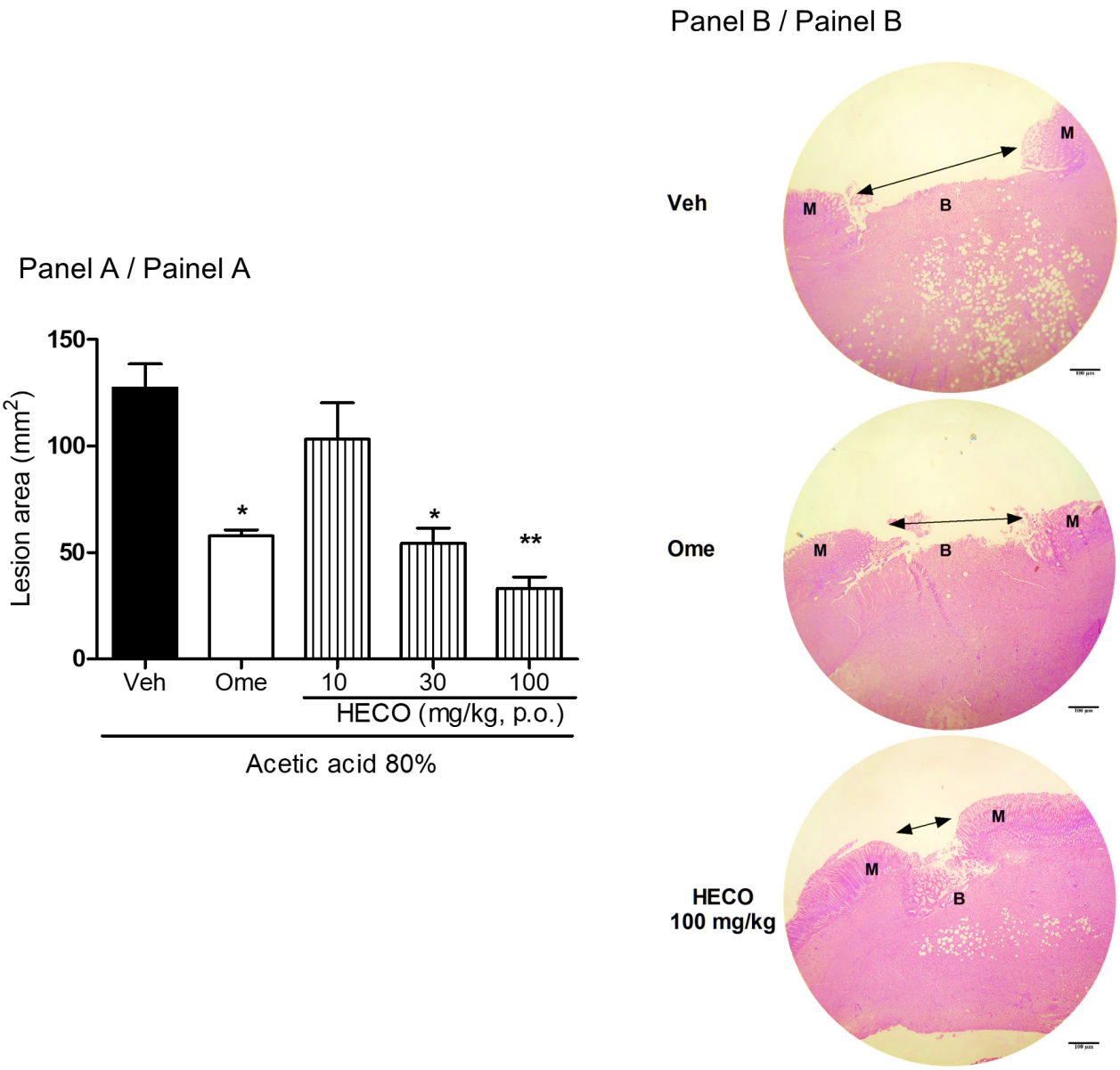


Figure 2 - Effects of HECO (10, 30 and 100 mg/kg) on chronic gastric ulcers induced by 80% acetic acid. Panel A: gastric ulcer area (mm^2). The results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ when compared to vehicle group (Veh). Panel B: representative histological cuts from groups treated with vehicle (water) (Veh), omeprazole (Ome) (20 mg/kg), and HECO (100 mg/kg), respectively. Hematoxylin/Eosin (HE) staining. The rats were treated orally twice a day for seven days with vehicle (water), omeprazole (Ome) or HECO (100 mg/kg). The arrows indicate the ulcer site, bars = 10 mm and histological section increased by 25x, M and B indicate margin and base of ulcer, respectively.

Figura 2 - Efeitos do HECO (10, 30 e 100 mg / kg) nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%. Painel A: área de úlcera gástrica (mm^2). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) A comparação estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo (Veh). Painel B: cortes histológicos representativos dos grupos tratados com veículo (água) (Veh), omeprazol (Ome) (20 mg / kg) e HECO (100 mg / kg), respectivamente. Coloração com hematoxilina/eosina (HE). Os ratos foram tratados por via oral duas vezes ao dia durante sete dias com veículo (água), omeprazol (Ome) ou HECO (100 mg / kg). As setas indicam o local da úlcera, barras = 10 mm e o corte histológico aumentado em 25x, M e B indicam margem e base da úlcera, respectivamente.

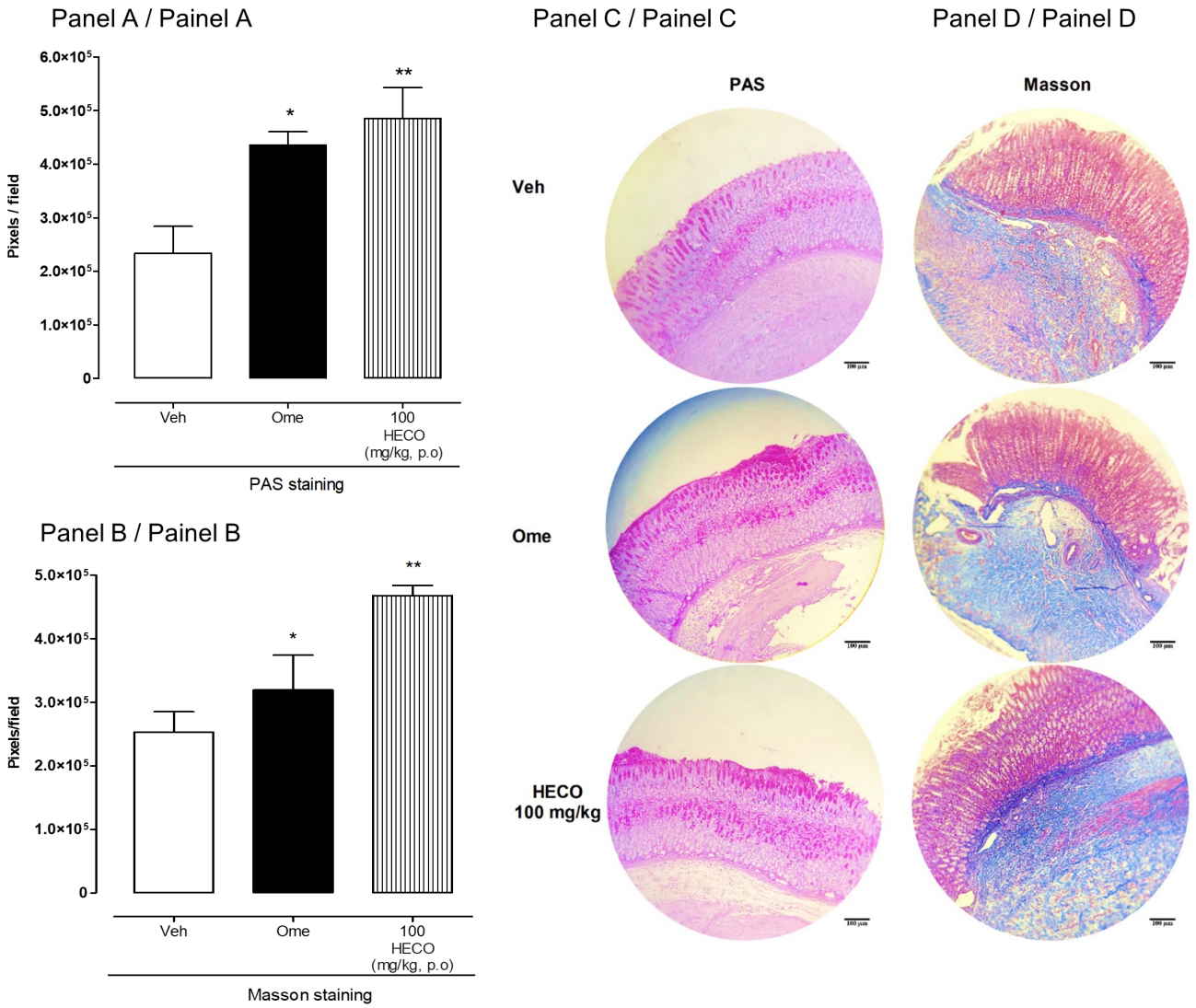


Figure 3 - Effects of HECO on histochemical staining for mucin-like glycoproteins (Schiff's Periodic Acid - PAS) and Collagen fibers (Masson's trichrome). Panels A and B: mucins and collagen fibers quantification in pixels, respectively. The quantifications were made using the ImageJ program. The results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ when compared to vehicle group (Veh). Panels C and D: representative histological cuts from groups treated with vehicle (water) (Veh), omeprazole (Ome) (20 mg/kg) and HECO (100 mg/kg) orally twice a day for seven days, respectively. In Panel C, Schiff's Periodic Acid (PAS) staining with mucins visible in rose. In Panel D: Masson's trichrome (Masson) staining with collagen fibers visible in blue.

Figura 3 -Efeitos do HECO na coloração histoquímica para glicoproteínas semelhantes à mucina (ácido periódico de Schiff - PAS) e fibras de colágeno (tricrômico de Masson). Painéis A e B: quantificação de mucinas e fibras colágenas em pixels, respectivamente. As quantificações foram feitas usando o programa ImageJ. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) A comparação estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni. * $p <0,05$, ** $p <0,01$ quando comparado ao grupo veículo (Veh). Painéis C e D: cortes histológicos representativos dos grupos tratados com veículo (água) (Veh), omeprazol (Ome) (20 mg/kg) e HECO (100 mg/kg) por via oral duas vezes ao dia por sete dias, respectivamente. No Painel C foram utilizadas coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e as mucinas foram coradas em rosa; no painel D: foi utilizada coloração tricrômica de Masson (Masson) e fibras colágenas foram coradas em azul.

groups that received HECO 100 mg/kg and omeprazole 20 mg/kg (Figure 4).

Chandra et al. (6) evaluated the gastroprotective effect of *C. officinalis* ethanolic extract in ethanol-induced and indomethacin-induced ulcer models. In this study, the administration of extract 100 and 200 mg/kg orally, produced significant inhibition of ulcer index in both models of ulcers. Antisecretory activity in a pylorus ligature-model was also observed, with decreasing in gastric secretion volume and increase in pH, in addition to elevated GSH level in indomethacin-induced ulcers and gastric mucus level in all models of ulcers used. Safety aspects of *C. officinalis* extract were also evaluated in this study. The results showed reversion the increase of serum alanine aminotransferase (ALT) levels observed in the control group, while aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total protein, albumin, bilirubin direct and albilirubin total were kept in normal range, and in toxicity acute study the extract was found to be safe up to 2000 mg/kg with no signs of mortality or change in behavioral pattern. These findings suggest that *C. officinalis* extract is not toxic and safe.

Após a depleção do muco, também ocorre um aumento significativo na produção de radicais livres, causando danos às células e às membranas celulares devido ao estresse oxidativo excessivo (31). Em condições fisiológicas, altas concentrações de GSH são encontradas na mucosa gástrica. Considerando seu potente efeito antioxidante sua presença é importante para proteger a mucosa do estresse oxidativo (32, 33). Foi relatada uma forte relação entre a diminuição dos níveis de GSH e o aumento dos níveis de gravidade da úlcera (34). Portanto, os níveis de GSH foram quantificados nesta investigação. Os resultados mostraram que, no local da úlcera, nos grupos que receberam HECO 100 mg/kg e omeprazol 20 mg/kg, houve um aumento significativo nos níveis de GSH (Figura 4).

Chandra et al. (6) avaliaram o efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *C. officinalis* em modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina. Neste estudo, a administração do extrato 100 e 200 mg/kg por via oral produziu inibição significativa no índice de úlcera nos dois modelos. Também foi observada atividade antissecretora no modelo de ligadura pilórica com diminuição do volume de secreção gástrica e aumento do pH, além da elevação do nível de GSH nos modelos de úlceras induzidas por indometacina e no nível de muco gástrico

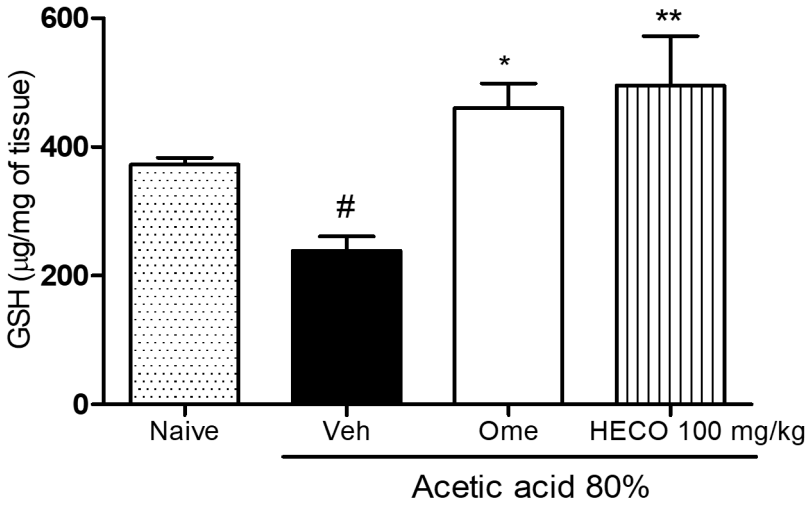


Figure 4 - Effects of HECO 100 mg/kg on reduced glutathione (GSH) levels on chronic gastric ulcers induced by 80% acetic acid. The results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6). Statistical comparison was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. #p<0.05 when compared to non-ulcerated group (Naive). *p<0.05, **p<0.01 when compared to vehicle group (Veh). The rats were treated orally twice a day for seven days with vehicle (water), omeprazole (Ome), or HECO (100 mg/kg).

Figura 4 - Efeitos de HECO 100 mg/kg nos níveis de glutationa reduzida (GSH) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). A comparação estatística foi realizada usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. #p <0,05 quando comparado ao grupo não ulcerado (Naïve). * p <0,05, ** p <0,01 quando comparado ao grupo veículo (Veh). Os ratos foram tratados por via oral duas vezes ao dia durante sete dias com veículo (água) omeprazol (Ome) ou HECO (100 mg/kg).

Yadav et al., (35) investigated gastroprotective effects of a 50% *C. officinalis* ethanolic extract. The findings showed significant inhibition in the formation of ulcers induced by physical (stress) and chemical agents (ethanol), with reducing oxidative stress in gastric tissue as evidenced by lipid peroxidation (LPO) and superoxide dismutase (SOD) decreasing and, increase in catalase (CAT).

The extract dichloromethane obtained from *C. officinalis* flowers was evaluated in vitro on the NF-κB pathway using AGS human gastric cancer cells. NF-κB, when activated by proinflammatory stimuli, translocates into the cell nucleus, where it promotes the transcription, encoding many mediators of the inflammatory process. The authors related evidence that *C. officinalis* exerts anti-inflammatory activity on the gastric cells by the inhibition of the NF-κB system. Using bio-guided fractionation were identified triterpenic saponins (faradiol-3-myristate and the corresponding aglycone) as responsible, at least in part, for the observed effect (36). In another study, four triterpenic saponins isolated from *C. officinalis* were evaluated in ethanol and indomethacin-induced ulcer models, and results showed that all presented a significant gastroprotective effect in ethanol-induced ulcer, while in indometacin-induced ulcers only one saponin was not active (1). These data confirm the importance of triterpenic saponins to gastroprotective of *C. officinalis*, in addition to the phenolic compounds identified in this study.

On the other hand, in a study considering the effect of *C. officinalis* infusion on indomethacin-induced gastric ulcers, Bertges et al., (37) conclude that the oral administration of *C. officinalis* infusion did not reduce the neutrophilic and lymphocytic infiltrates, as well as gastric lesions indomethacin-induced in the studied period. These results are contradictory with the findings observed in this and other studies, however, this could be explained due to differences in extraction process, treatment time, and dose used, considering that the infusion is considerably more diluted than extracts and treatment was carried out for only two days.

Thus, our results corroborate with previous works and contribute to a better knowledge of the antiulcer and gastroprotective properties of *C. officinalis*. However, all previous studies utilized acute ulcer models, therefore, it is important to remember that this study is one of the first concerning the potential of *C. officinalis* extract in healing chronic gastric ulcer.

em todos os modelos de úlceras testados. Ainda neste estudo, foram considerados aspectos de segurança do extrato de *C. officinalis*. Os resultados mostraram reversão do aumento dos níveis séricos de Alanina Aminotransferase (ALT) observados no grupo controle, além disso, os níveis de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), proteína total, albumina, bilirrubina direta e bilirrubina total foram mantidos na faixa normal e no estudo de toxicidade aguda, o extrato foi considerado seguro até 2000 mg/kg, sem provocar quaisquer sinais de mortalidade ou alteração no padrão comportamental. Esses achados sugerem que o extrato de *C. officinalis* não é o apresenta toxicidade significativa.

Yadav et al., (35) investigaram os efeitos gastroprotetores do extrato etanólico 50% de *C. officinalis*. Os resultados mostraram inibição significativa na formação de úlceras induzidas por agentes físicos (estresse) e químicos (etanol), com redução do estresse oxidativo no tecido gástrico, como evidenciado pela diminuição da peroxidação lipídica (LPO) e superóxido dismutase (SOD) e aumento da catalase (CAT).

Os efeitos do extrato de diclorometano obtido das flores de *C. officinalis* na via do NF-κB foram avaliados in vitro, usando células de câncer gástrico humano (AGS). O NF-κB, quando ativado por estímulos pró-inflamatórios, transloca-se para o núcleo celular, onde promove transcrição, codificando muitos mediadores do processo inflamatório. Os autores relataram evidências de que *C. officinalis* exerce atividade anti-inflamatória nas células gástricas pela inibição da via mediada pelo NF-κB. Utilizando fracionamento bio-guiado, foram identificadas saponinas triterpênicas (faradiol-3-miristato e aglicona correspondente) os quais foram responsáveis, pelo menos em parte, pelo efeito observado (36). Em outro estudo, quatro saponinas triterpênicas isoladas de *C. officinalis* foram avaliadas em modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina, e os resultados mostraram que todas apresentaram efeito gastroprotetor significativo na úlcera induzida por etanol, enquanto na úlcera induzida por indometaicina apenas uma saponina não foi ativa (1). Estes dados confirmam a importância das saponinas triterpênicas para o gastroprotetor de *C. officinalis*, além dos compostos fenólicos identificados neste estudo.

Por outro lado, em estudo considerando o efeito da infusão de *C. officinalis* nas úlceras gástricas induzidas por indometacina, Bertges et al., (37) concluíram que a administração oral da infusão não reduziu os infiltrados neutrofílicos e linfocitários, bem como como as lesões gástricas induzidas por indometacina no período estudado. Esses resultados são contraditórios com os resultados deste e de outros estudos, no entanto, isso

Conclusion

In summary, results showed that a hydroalcoholic extract of *C. officinalis* inflorescences displays healing chronic gastric ulcer activity. The data suggest that effectiveness is related, at least part, to the capacity of extract to increase protective factors of gastric mucosa such as mucus and antioxidant factors as well as an increase in collagen synthesis. In addition, the findings of this study suggest that phytotherapeutic products can be obtained from *C. officinalis* inflorescences for the development of new drugs to treat gastric ulcers. It also contributed to the validation of the folk use of this specie for the treatment of gastric ulcers.

Author Contributions Statement

LNBM, LBS, TB, VSB, and ACA performed pharmacological assays. LCK Jr prepared the extract and did the phytochemical analysis. LMS and SFA ensured statistical analysis, wrote and corrected the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) and Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) for their financial support.

Conflict of interests

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

pode ser explicado devido a diferenças no processo de extração, tempo de tratamento e dose utilizada, considerando que a infusão é consideravelmente mais diluída que os extratos e o tratamento foi realizado por apenas dois dias.

Assim, nossos resultados corroboram com trabalhos anteriores e contribuem para um melhor conhecimento das propriedades antiulcera e gastroprotetoras de *C. officinalis*. No entanto, todos os estudos anteriores foram realizados em modelos agudos de úlcera, assim, é importante reforçar que este é o primeiro a respeito do potencial do extrato de *C. officinalis* na cicatrização de úlcera crônica gástrica.

Conclusões

Em resumo, os resultados mostraram que o extrato hidroalcoólico de inflorescências de *C. officinalis* possui atividade cicatrizante da úlcera crônica gástrica. Os dados sugerem que a eficácia está relacionada, pelo menos em parte, à capacidade do extrato em aumentar os fatores protetores da mucosa gástrica, como o muco e os fatores antioxidantes, bem como o aumento da síntese de colágeno. Os resultados sugerem que produtos fitoterápicos podem ser obtidos a partir das inflorescências de *C. officinalis* para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de úlceras gástricas. Além disso, os achados desta investigação também contribuem para a validação do uso popular dessa das inflorescências desta planta no tratamento de úlceras gástricas.

Declaração sobre as Contribuições dos Autores

LNBM, LBS, TB, VSB, e ACA realizaram ensaios farmacológicos. LCK Jr preparou o extrato e realizou análises fitoquímicas. LMS e SFA realizaram análises estatísticas, escreveram e corrigiram o manuscrito.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) pelo apoio financeiro.

Conflito de interesses

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

References / Referências

1. Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. Medicinal Flowers. III.1) Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2001; 49: 863-870.
2. Leach M.J. *Calendula officinalis* and wound healing: a systematic review. Wounds 2008; 20: 236–243.
3. Khare CP. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC; 2007. Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary; pp. 111–2.
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.
5. Basch E, Bent S, Foppa I, Haskmi S, Kroll D, Mele M, Szapary P, Ulbricht C Vora M, Yong S. Marigold (*Calendula officinalis* L.): An Evidence-Based Systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration. Journal of Herbal Pharmacotherapy. 2006; 6: 135-159.
6. Chandra P, Kishore K, Ghosh A.K. Evaluation of antacid capacity and antiulcer activity of *Calendula officinalis* L. in experimental rats. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 2015; 15: 277-285.
7. Kangwan N, Park JM, Kim EH, Hahm KB. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology. 2014; 15: 40-47.
8. Dacha S, Razvi M, Massaad J, Cai Q, Wehbi M. Hypergastrinemia. Gastroenterology 2015; 3: 201–208.
9. Fox RK, Muniraj T. Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Diseases. The Medical Clinics of North America. 2016; 100: 827–850.
10. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, volume 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2019. 873p. Available: http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira
11. Okabe S, Roth LA, Pfeier JA. A Method for experimental penetrating gastric and duodenal, ulcers in rats. The American Journal of Digestive Diseases. 1971; 16: 277-284.
12. Da Silva LM, Boeing T, Somensi LB, Cury BJ, Steimbach VM, Silveria AC, Niero R, Chechinel-Filho V, Santin JR, Andrade SF. Evidence of gastric ulcer healing activity of Maytenus robusta Reissek: In vitro and in vivo studies. Journal of Ethnopharmacology. 2015; 175: 75-85.
13. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total prote in bound and nonprotein sulfhydril groups in tissues with Ellman's reagent. Analytical Biochemistry. 1968; 25: 192-205.
14. Faustino MV, Pinto DCGA, Gonçalves MJ, Salguerio L, Silveira P, Silva AMS. Calendula L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. Journal of Ethnopharmacology. 2018; 45: 254-267.
15. Cuyckens F, Rozengberg R, de Hoffmann E, Clayes M. Structure characterization of flavonoid O-diglycosidesby positive and negative nano-electrospray ionizationion trap mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. 2001; 36: 1203-1210.
16. Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I, Carle R. Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (Malus domestica cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. Phytochemical Analysis. 2002; 13, 87-94.
17. Felipe DF, Brambilla LZS, Porto C, Pilau EJ, Cortez DAG. Phytochemical analysis of Pfaffia glomerata inflorescences by LC-ESI-MS/MS. Molecules. 2014; 19: 15720-15734.
18. Clifford MN, Knight S, Kuhnert NA. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC–MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53: 3821–3832.
19. Fonseca YM, Vicentini FTMC, Catini CD, Fonseca MJV. Determination of rutin and narcissin in marigold extract and topical formulations by liquid chromatography: applicability in skin penetration studies. Química Nova. 2010; 33(6):1320-1324.
20. World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants – Volume 2. 2002: 35-44.
21. Klein-Jr LC, Santin JR, Niero R, Andrade SF, Cechinel-Filho V. The therapeutic lead potential of metabolites obtained from natural sources for the treatment of peptic ulcer. Phytochemistry Reviews. 2012; 11: 567–616.
22. Costa P., Almeida MO., Lemos M., Arruda C., Casoti R., Somensi LB., Boeing T., Mariott M., Silva RCMVAF, Stein BP, Souza P, Santos AC, Bastos JK, Da Silva LM, Andrade SF. Artepillin C, Drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and Kaempferide from Brazilian Green Propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. Journal of Ethnopharmacology. 2018; 226: 82-89.
23. Nakao K-I, Ro A, Kibayashi K. Evaluation of the morphological changes of gastric mucosa induced by a low concentration of acetic acid using a rat model. Journal of Forensic and Legal Medicine. 2014; 22: 99–106.
24. Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models—the history and state of the art of peptic ulcer research. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005; 28: 1321-1341.
25. Calvi ENC, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SSM, Silva MS, Franco MF, Ferreira LM. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. Acta Cirúrgica Brasileira. 2012; 27(10): 681-686.
26. Shahin M, Gillessen A, Pohle T, Weber C, Schuppan D, Herbst H, Domschke W. Gastric ulcer healing in the rat: kinetics and localisation of de novo procollagen synthesis. Gut. 1997;41(2):187-94.
27. McColl KEL. The elegance of the gastric mucosal barrier: designed by nature for nature. Gut. 2012; 61(6): 787-788.
28. Rodríguez-Piñeiro AM, Bergström JH, Ermund A, Gustafsson JK, Schütte A, Johansson ME, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 2013; 305(5): 348-356.
29. Amagase K, Yokota M, Tsukimi Y, Okabe S. Characterization of "unhealed gastric ulcers" produced with chronic exposure of acetic acid ulcers to indomethacin in rats. Journal of Physiology and Pharmacology. 2003; 54(3): 349-60.
30. Shahin M, Konturek JW, Pohle T, Schuppan D, Herbst H, Domschke W. Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. Microscope Research and Technique. 2001; 53(6): 396-408.
31. Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. Journal of Physiology and Pharmacology. 2002; 53: 39–50.
32. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden J, Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense environmental. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2001; 10: 141-152.
33. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2003; 57(3–4): 145–155.
34. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee R.K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. Free Radical Biology and Medicine. 2006; 40(8):1397–1408.
35. Yadav AK, Mishra PK, Jain PK, Rao CV, Tiwaril S, Singh V. Investigation of *Calendula officinalis* whole plant as a gastroprotective and antioxidant in peptic ulcer. British Journal of Medical and Health Research. 2016; 3(7).
36. Colombo E, Sangiovanni E, D'Ambrosio M, Bosisio E, Ciocarlan A, Fumagalli M, Guerriero A, Harghel P, Dell'Agli1 M. A Bio-Guided Fractionation to Assess the Inhibitory Activity of *Calendula officinalis* L. on the NF-κB Driven Transcription in Human Gastric Epithelial Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015, Article ID 727342, 8 pages.
37. Bertges LC, Felga AMG, Teixeira JBP, Pimentel CFMG, Neves PO. Effect of *Calendula officinalis* infusion on indomethacin-induced gastric lesions in Wistar rats. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2006; 11(2).

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.,* 2020; 17(1): 90-101

doi: 10.19277/bbr.17.1.228

Rheological, texture, and sensory analyses and *in vivo* clinical efficacy of cosmetic formulations containing ascorbyl tetraisopalmitate

Análises reológica, de textura, e sensorial e eficácia clínica in vivo de formulações cosméticas contendo tetraisopalmitato de ascorbila

G. C. Bonilha, G. M. D. Costa, P. M. B. G. Maia Campos*

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Av do Café, s/nº, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14040-903

*Corresponding author: pmcampos@usp.br

Abstract

Cosmetics with anti-aging effects using ingredients of sustainable origin are increasing in the cosmetic market. This study aimed to evaluate the physical-mechanical and sensory properties and immediate clinical efficacy of cosmetic formulations with ingredients from natural sources to which were added or not (vehicle only) ascorbic acid (AAS) or ascorbyl tetraisopalmitate (ATIP). The preliminary stability, physical-mechanical properties, rheology texture profile, and sensory analysis were performed. In addition, immediate clinical effects in terms of skin hydration, transepidermal water loss (TEWL), and skin microrelief were investigated on the forearms and in the faces of nineteen subjects by non-invasive biophysical and skin imaging techniques. There were slight changes in the formulations with AAS submitted to thermal stress, but they were stable under ambient temperature. All formulations were effective in skin hydration. Serums and gel cream with ATIP decreased TEWL but did not significantly change the microrelief parameters. The serum achieved good sensory acceptance and parameters were correlated to those obtained by the texturometer. The best performance was from serum with ATIP, whereas gel cream was not well accepted. Therefore, results showed a correlation between physical-mechanical and sensorial properties, in addition to better stability and acceptance of the fat-soluble form of vitamin C.

Keywords: serum formulation, vitamin C, natural ingredients, clinical efficacy

Resumo

Cosméticos *antiaging* com ingredientes naturais de origem sustentável são crescentes no mercado cosmético. Esse trabalho teve por objetivo avaliar as propriedades físico-mecânicas e sensoriais e a eficácia clínica imediata de formulações cosméticas à base de ingredientes de origem natural, nas formas de *sérum* e de gel creme, acrescidas ou não (veículo) de ácido ascórbico (AAS) ou tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA) Foram avaliadas estabilidade preliminar, propriedades físico-mecânicas através de perfis de textura e reologia, análise sensorial e eficácia imediata nos antebraços e face de dezenove participantes, analisando hidratação, perda transepidérmica de água (TEWL) e microrrelevo cutâneo, por técnicas não invasivas incluindo a imagem da pele. Houve leves alterações nas formulações com AAS submetidas ao estresse térmico, sendo estáveis sob temperatura ambiente. As formulações foram eficazes na hidratação da pele e os *séruns* e gel creme que continham TIPA diminuíram a TEWL, mas não alteraram significativamente os parâmetros do microrrelevo. O *sérum* obteve boa aceitação sensorial, com parâmetros correlacionados aos obtidos pelo texturômetro, sendo o *sérum* com TIPA melhor avaliado, enquanto que o gel creme não foi bem aceito. Portanto, os resultados obtidos mostraram relação entre características físico-mecânicas e sensoriais, além da melhor estabilidade e aceitação da forma lipossolúvel da vitamina C.

Palavras-chave: *sérum* formulation, vitamina C, ingredientes de origem natural, eficácia clínica

Received / *Recebido*: 26/06/2019
Accepted / *Aceite*: 21/04/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Antiaging, minimizing skin changes caused by aging or photoaging, is one of the most desired characteristics for some cosmetic consumers. Products claiming antiaging effects intend to act in the improvement of skin hydration and skin pigmentation pattern while potentially reducing expression lines. Antioxidants compounds have been added to cosmetic anti-aging formulations due to their reductive properties, neutralizing reactive oxygen species and minimizing the damage that could be caused to DNA and protein molecules (1).

Among the main antioxidants used is ascorbic acid or vitamin C, which also acts as an essential cofactor in the enzymatic reaction of collagen synthesis, and improves overall skin appearance (2-5). However, ascorbic acid can exhibit instability in the presence of oxygen, high temperatures, light, and high pH. Formulations containing ascorbic acid may lose their antioxidant potential, as well as undergo visible changes over time, especially in colour (2,6).

Because of their higher stability, some formulations have different forms of vitamin C, such as the fat-soluble derivative ascorbyl tetraisopalmitate, whose applications and stability has been described in studies and has shown proven efficacy as a precursor of vitamin C, offering the same positive effects and other benefits related to penetration and hydration (7). However, in order to increase the production of collagen, it is necessary to have the vitamin in its free form. Therefore, there must be a mechanism of hydrolysis of the compound after penetration, which may imply a partial use of the substance, as the conversion might not be sufficiently effective.

There has been a search for more natural and biocompatible products in the cosmetic market, those which are composed of ingredients of natural or sustainable origin and present a pleasant cosmetic form, since the sensory perception influences on the purchase and use (8). In this context, serums have had high adhesion by the consumer due to their practical application, as they usually have good spreadability, fast absorption, and low stickiness (9). This study aimed to evaluate the physical-mechanical and sensory properties and immediate clinical efficacy of cosmetic formulations based on ingredients from natural sources in the form of serum and gel cream to which were added or not (vehicle only) ascorbic acid (AAS) or ascorbyl tetraisopalmitate (ATIP).

Introdução

Antienvelhecimento é um dos apelos mais desejados para o consumidor de cosméticos, o qual consiste em minimizar as alterações da pele causadas pelo envelhecimento ou fotoenvelhecimento. Os produtos que reivindicam efeitos antienvelhecimento visam atuar na melhoria do padrão de hidratação e pigmentação da pele, enquanto podem reduzir as linhas de expressão. Os antioxidantes são compostos que vem sendo muito adicionados em formulações cosméticas *antiaging* em função das suas propriedades redutoras, neutralizando as espécies reativas de oxigênio e minimizando os danos que poderiam ser causados às moléculas de DNA e proteínas (1).

Dentre os principais antioxidantes adicionados está o ácido ascórbico ou vitamina C, que também age como cofator essencial na reação enzimática de síntese de colágeno, promovendo a melhora da aparência geral da pele (2-5). No entanto, pode apresentar instabilidade na presença de oxigênio, altas temperaturas, luz e pH elevado, e as formulações que o contêm podem perder seu potencial antioxidante, assim como sofrer alterações visíveis ao longo do tempo, especialmente na cor (2,6).

Algumas formulações têm formas derivadas da vitamina C, por apresentarem maior estabilidade, como o derivado lipossolúvel tetraisopalmitato de ascorbila, que já teve suas aplicações e estabilidade descritas em estudos, mostrando eficácia comprovada como um precursor da vitamina C, com os efeitos dessa e outros benefícios relacionados à penetração e hidratação (7). Entretanto, para que haja aumento da produção de colágeno, é necessária a presença da vitamina na forma livre. Por isso, deve haver um mecanismo de hidrólise do composto após a penetração, o que pode implicar em um aproveitamento parcial da substância, uma vez que a conversão pode não ser efetiva o suficiente.

No mercado cosmético há uma busca por produtos mais naturais e biocompatíveis, os quais são compostos por ingredientes de origem natural ou sustentável, e com forma cosmética agradável, uma vez que a percepção sensorial influencia na compra e uso (8). Nesse contexto, os *séruns* têm tido alta aderência pelo consumidor, devido à praticidade de aplicação, uma vez que apresentam boa espalhabilidade, rápida absorção e baixa pegajosidade (9). Este estudo teve por objetivo avaliar as propriedades físico-mecânicas e sensoriais e a eficácia clínica imediata de formulações cosméticas à base de ngredientes de origem natural, nas formas de *sérum* e de gel creme, adicionadas ou não (veículo) de ácido ascórbico (AAS) ou tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA).

Material and Methods

The studied formulations are described in the Table 1. More than 97% of the composition of the developed vehicles were ingredients of natural or sustainable origin. The gel cream (GC) and serum (SE) cosmetic forms had the same aqueous phase and thus mostly the same composition. Formulations were evaluated as vehicle (without active ingredients) and with ATIP or with AAS, incorporated at 2%.

Formulations' characterization and preliminary stability tests

Formulations were submitted to centrifugation using a centrifuge test (CentiBio® 80-2B, Biovera, Brazil) to evaluate the occurrence of phase separation. Rheological analysis of formulations was performed using a cone and plate type digital rheometer (DV-III®, AMETEK Brookfield Middleboro, MA, USA), with 0.500 g of formulation in each analysis, obtaining apparent minimum viscosity, flow and consistency indexes, and thixotropy values. The texture profile was studied from spreadability, texture and hardness tests obtained with a texturometer (TA.XT/Plus®50, Extralab, Itatiba, SP,

Material e Métodos

As formulações estudadas são descritas na Tabela 1, sendo que mais de 97% da composição dos veículos desenvolvidos eram ingredientes de origem natural ou sustentável. As formas cosméticas gel creme (GC) e *sérum* (SE) tiveram a mesma fase aquosa e, assim, a maior parte da composição em comum. As formulações foram avaliadas na forma de veículo (sem ingredientes ativos) e com TIPA ou AAS, incorporados a 2%.

Caracterização e testes de estabilidade preliminar das formulações

As formulações foram submetidas a um teste de centrifugação em centrífuga (CentiBio® 80-2B, BioVera, Brasil) para avaliar ocorrência de separação de fases. A análise reológica das formulações foi realizada no digital reômetro tipo cone e placa (DV-III® AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, EUA), com 0,500 g de formulação em cada análise, obtendo valores de viscosidade aparente, índices de fluxo e de consistência e tixotropia. O perfil de textura foi estudado com testes de espalhabilidade, textura e dureza, feitos no texturômetro (TA.XT/Plus®50, Extralab, Itatiba, SP, Brasil), que

Table 1 - Composition of studied formulations: GC, GC-AAS, GC-ATIP, SE, SE-AAS and SE-ATIP
Tabela 1 - Composição das formulações estudadas: GC, GC-AAS, GC-TIPA, SE, SE-AAS e SE-TIPA

Composition/ Composição (INCI Name)	**Supplier/ Fornecedor**	**Formulations/ Formulações**					
		GC	**GC-AAS**	**GC-ATIP / GC-TIPA**	**SE**	**SE-AAS**	**SE-ATIP / SE-TIPA**
Hydroxyethylcellulose	Galena®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Xanthan gum	CP Kelco®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Disodium EDTA	Mapric®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sodium metabisulfite	Mapric®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Propylene glycol	Nikkol®/Galena®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glycerin	Mapric®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C13-15 Alkane	Neossance®/Galena®	✓	✓	✓			
Steareth-2	Croda®	✓	✓	✓			
Steareth-21	Croda®	✓	✓	✓			
Butylated hydroxytoluene	Mapric®	✓	✓	✓			
Xylityl Sesquicaprylate	Chemyunion®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Aqua	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Polyglyceryl-10 Myristate, Triethylhexanoin, Glycerin, Water	Nikkol®/Galena®	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ascorbyl Tetraisopalmitate	Nikkol®/Galena®			✓			✓
Ascorbic acid	Galena®		✓			✓	

Brazil), which provides time-dependent power graphs (10). The spreadability test ("TTC Spreadability Rig") provided results of firmness and work of shear, the texture test (A/BE-d45 "Back extrusion Rig 45 mm DISC") indicated parameters of firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index, and the hardness test ("P/45C" Penetration conical probe) resulted in hardness, cohesiveness and stickiness values.
The formulations were GC (vehicle gel cream), GC-AAS (gel cream with AAS), GC-ATIP (gel cream with ATIP), SE (vehicle serum), SE-AAS (serum with AAS) and SE-ATIP (serum with ATIP). These were submitted to a preliminary stability study, stored at temperatures of 25 °C and 45 °C, and measuring pH (Tecnal® TEC-3MPp, Tecnopon, Piracicaba SP, Brazil) and rheology, as well as visually evaluating organoleptic characteristics (appearance, colour, odour), for 14 days.

Study Participants

Nineteen female subjects, aged from 39 to 55 years (medium of 46.3 ± 4.6 years old), Fitzpatrick skin phototype II and III, were enrolled and signed a free and informed consent form. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of Sao Paulo (CAAE: 84599418.8.0000.5403). The subjects were divided into three balanced groups with average baseline hydration measurements in the malar region of the face approximately equal between them.

Methodology

Sensory analysis and immediate efficacy tests were performed in the clinical studies. In the sensory analysis, seven randomized areas of 4 cm² of the inner part of the forearms were studied for all formulations (GC, GC-AAS, GC-ATIP, SE, SE-AAS and SE-ATIP) according to the participants' perception after the application (20 µL) of formulations in each determined region of the forearm, maintaining one clean for control. Questionnaires were graded from one to five (bad, regular, good, very good and excellent, respectively) and applied to assess the moisture and soft skin feeling, spreadability, stickiness, skin touch (immediately after application and after five minutes), and purchase intention.
For the efficacy tests, each group received the application of one of the three serums (SE, SE-AAS or SE-ATIP) on the entire face (1 g of formulation). Evaluation took place the malar region application, before and two hours after application, as well as all areas and on the forearm in those areas used for sensory analysis. The stratum corneum water content was measured in five replicates (Corneometer® TMCM 825, Courage

fornece gráficos de força em função do tempo (10). O teste de espalhabilidade ("TTC Spreadability Rig") forneceu resultados de firmeza e trabalho de cisalhamento, o teste de textura (A/BE-d45 "Back extrusion Rig 45 mm DISC"), indicou parâmetros de firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade, e o teste de dureza (probe cônico de penetração "P/45C") resultou em valores de dureza, coesividade e pegajosidade.
As formulações GC (gel creme veículo), GC-AAS (gel creme com AAS), GC-TIPA (gel creme com TIPA), SE (*sérum* veículo), SE-AAS (*sérum* com AAS) e SE-TIPA (*sérum* com TIPA) foram submetidas a estudo de estabilidade preliminar, armazenadas em temperatura de 25 °C e em estufa à 45 °C, sendo registrados valores de pH (Tecnal® TEC-3MPp, Tecnopon, Piracicaba SP, Brazil) e reologia por 14 dias, além da avaliação visual de características organolépticas (aspecto, cor, odor).

Participantes do estudo

Foram recrutadas dezenove participantes de pesquisa do sexo feminino, faixa etária de 39 a 55 anos (média de 46,3 ± 4,6 anos) e fototipos de *Fitzpatrick* II e III, que assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE: 84599418.8.0000.5403). As participantes foram divididas em três grupos equilibrados com medidas basais médias de hidratação na região malar do rosto aproximadamente iguais entre eles.

Metodologia

Nos estudos clínicos, foram realizadas análises sensoriais e testes imediatos de eficácia. Na avaliação sensorial, foram estudadas sete áreas randomizadas de 4 cm² da parte interna dos antebraços para todas as formulações (GC, GC-AAS, GC-TIPA, SE, SE-AAS e SE-TIPA) de acordo com a percepção das participantes após a aplicação (20 µL) das formulações em cada região demarcada do antebraço, mantendo uma limpa para controle. Questionários foram classificados de um a cinco (ruim, regular, bom, muito bom e ótimo, respectivamente) e aplicados para avaliar a sensação de hidratação e maciez da pele, espalhabilidade, pegajosidade, sensação ao toque imediata e após cinco minutos, e intenção de compra.
Para os testes de eficácia, cada grupo recebeu a aplicação de um dos três *séruns* (SE, SE-AAS ou SE-TIPA) no rosto todo (1 g de formulação) e a avaliação foi feita na região malar, antes e após duas horas da aplicação, nas mesmas áreas do antebraço usadas para a análise sensorial. O conteúdo aquoso do estrato córneo foi me-

& Khazaka, Cologne, FRD) and TEWL values were obtained in triplicate (Tewameter® TM210, Courage & Khazaka, Cologne, FRD). Skin microrelief images were recorded (VisioScan® VC98, Courage & Kazaka, Cologne, FRD) and analysed for parameters which describe the skin surface (SELS - Surface Evaluation of Living Skin): SEr (roughness), SEsc (desquamation), SEw (number and width of wrinkles) and SEsm (smoothness).

Data analysis and Statistics

All statistical analysis had a 95% confidence interval and the data sets were analysed for normality before defining which statistical tests were applicable in each case. For rheology, texture, and pH data, unidirectional and Tukey analysis of variance tests, or Kruskal-Wallis non-parametric followed by Dunns, were applied. For clinical study data sets, the t-test was used for parametric and the Mann-Whitney test for non-parametric analysis.

Results and Discussion

In the preliminary centrifugation test, all formulations were unchanged. GC and SE vehicle formulations, and these added with ATIP, had an initial mean pH of 5.4, whereas those containing AAS had pH values of 3.3, on average, due to the acidic characteristic of the active substance.

The decision was made to not adjust the pH of the AAS formulations to avoid instability seen in preliminary tests with pH adjustments made. Thus, the formulation was recommended for night use only.

At rheological characterization, the shear stress curves (Figure 1) showed higher shear stress for the GC formulations, indicating higher viscosities than those of the serums. This behaviour was confirmed by minimum apparent viscosity and by the texture test results, in which the parameters of viscosity index and cohesiveness were higher for GC and GC-AAS, intermediate for GC-ATIP, and the lowest were found for the serums, with values very close to each other. In addition, both the consistency index from rheology and the firmness and consistency from texture test indicated higher values for the gel cream comparing to the serum. Hysteresis areas were the same and quite low, indicating the polymers' intrinsic characteristic of low thixotropy, since both xanthan gum and hydroxyethyl cellulose have pseudoplastic behaviour, with great ease of viscosity recovery once shear stress is no longer applied (11,12).

In the stability study by thermal stress, formulations

dido (Corneometer® TMCM 825, Courage & Khazaka, Cologne, RFA), em cinco réplicas, e valores de TEWL foram obtidos (Tewameter® TM210, Courage & Khazaka, Cologne, RFA) em triplicata. As imagens de microrrelevo cutâneo foram registradas (VisioScan® VC98, Courage & Khazaka, Cologne, RFA), e analisadas com relação aos parâmetros que descrevem a superfície da pele (SELS - Surface Evaluation of Living Skin): SEr (rugosidade), SEsc (descamação), SEw (número e largura das rugas) e SEsm (suavidade).

Análise de dados e Estatística

Todas as análises estatísticas tiveram 95% de intervalo de confiança e os conjuntos de dados foram analisados com relação à normalidade antes de definir quais os testes estatísticos aplicáveis em cada caso. Para dados de reologia, textura e pH, foram aplicados os testes de análise de variância unidirecional e Tukey, ou o não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Em dados do estudo clínico, foi utilizada a análise do t-test para dados paramétricos, e Mann-Whitney test para dados não-paramétricos.

Resultados e Discussão

Nos testes de estabilidade preliminar por centrifugação todas as formulações se mostraram inalteradas. As formulações GC e SE veículos, e adicionadas de TIPA, apresentaram pH inicial de 5,4, em média, já as que continham AAS tiveram valores de pH de 3,3, em média, devido à característica ácida da substância ativa. Optou-se por não corrigir o pH das formulações de AAS para evitar a instabilidade vista em testes preliminares com correção. Desta forma, a formulação foi recomendada apenas para uso noturno.

Na caracterização de reologia, as curvas de tensão de cisalhamento (Figura 1) mostraram maior tensão para cisalhar as formulações GC, com viscosidades superiores às dos *séruns*, comportamento confirmado pelos resultados de viscosidade mínima aparente, e pelo teste de textura, com os parâmetros de índice de viscosidade e de coesividade, em que GC e GC-AAS possuíram os maiores valores, GC-TIPA, se mostrou intermediário, e os *séruns* tiveram os menores, com valores bastante próximos. Além disso, tanto o índice de consistência da reologia, quanto a firmeza e consistência do teste de textura, apontaram valores superiores para o gel creme em relação ao *sérum*. As áreas de histerese foram bastante baixas e iguais, indicando a característica intrínseca dos polímeros de apresentarem baixa tixotropia, uma vez que tanto a goma xantana, quanto a hidroxietilcelulose, têm comportamento pseudoplástico, com

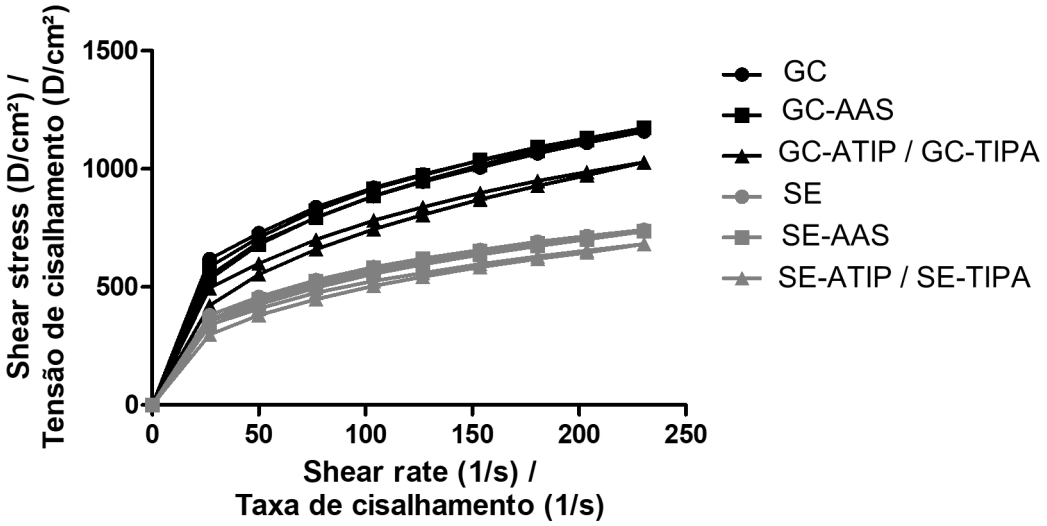


Figure 1 - Shear stress curves as a function of shear rate of the studied formulations
Figura 2 - Curvas de tensão de cisalhamento em função de taxa de cisalhamento das formulações estudadas

Table 2 - Measured pH values in the preliminary stability study of the GC, GC-AAS, GC-ATIP, SE, SE-AAS and SE-ATIP formulations
Tabela 2 - Valores medidos de pH ao longo do estudo de establidade preliminar das formulações GC, GC-AAS, GC-TIPA, SE, SE-AAS e SE-TIPA

	GC	GC-AAS	GC-ATIP / GC-TIPA	SE	SE-AAS	SE–ATIP / SE-TIPA
T0	5.47	3.37	5.19	5.38	3.24	5.52
	5.43	3.34	5.22	5.39	3.25	5.47
	5.41	3.31	5.22	5.38	3.26	5.45
T7 - 25°C	5.29	-	5.26	5.21	-	5.43
	5.33	-	5.23	5.27	-	5.40
	5.32	-	5.24	5.28	-	5.43
T7 - 45°C	5.41	-	5.28	5.24	-	5.34
	5.37	-	5.29	5.23	-	5.34
	5.32	-	5.29	5.25	-	5.30
T14 - 25°C	5.42	3.33	5.23	5.27	3.32	5.32
	5.45	3.33	5.22	5.24	3.32	5.31
	5.32	3.34	5.23	5.24	3.32	5.30
T14 - 45°C	5.29	3.31	5.41	5.20	3.27	5.17
	5.23	3.31	5.30	5.18	3.27	5.14
	5.17	3.32	5.32	5.17	3.29	5.16

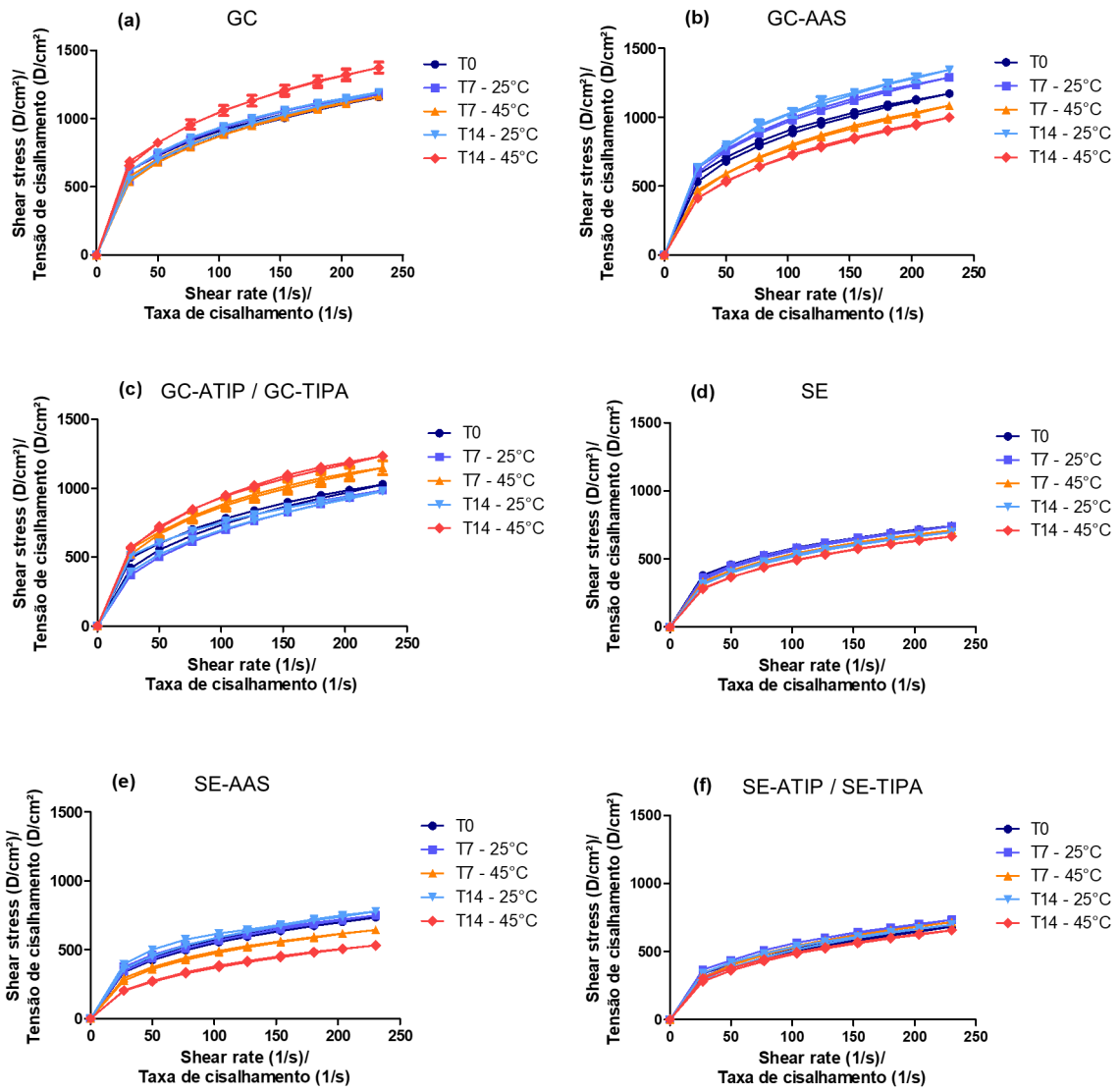


Figure 2 - Comparative results of shear stress curves versus shear rate during the preliminary stability study of formulations GC (a), GC-AAS (b), GC-ATIP (c), SE (d), SE-AAS (e) and SE- ATIP (f)

Figura 2 - Resultados comparativos das curvas de tensão de cisalhamento em função de taxa de cisalhamento ao longo do estudo de estabilidade preliminar das formulações GC (a), GC-AAS (b), GC-TIPA (c), SE (d), SE-AAS (e) e SE-TIPA (f)

those containing AAS showed a slight colour change after 14 days, likely due to an initiation of the oxidation process, and most showed an expected decrease in pH (Table 2), justified by the high aqueous content and the influence of temperature on pH (13). The apparent minimum viscosity and consistency index both decreased and there was an increase in flow index in the AAS formulations under thermal stress, confirming instability only under this condition (Figure 2). The SE and SE-ATIP formulations presented higher stability, and a similar result was obtained in a study of formulations containing ATIP, in which vehicle and formulation with active ingredient did not differ from each other in terms

grande facilidade de recuperação da viscosidade, uma vez que a tensão de cisalhamento para de ser aplicada (11,12).

No estudo de estabilidade por estresse térmico, as formulações que continham AAS apresentaram leve alteração de cor após 14 dias, devido a um provável início de oxidação, e a maior parte delas apresentou diminuição esperada do pH (Tabela 2), justificada pelo alto conteúdo aquoso e a influência da temperatura no pH (13). A viscosidade mínima aparente e índice de consistência diminuíram e houve aumento do índice de fluxo nas formulações de AAS em estresse térmico, confirmando instabilidade apenas nessa condição

of viscosity and consistency index parameters, which were kept stable through the preliminary study period with storage at temperatures of 25 °C and 45 °C (14).

The serum formulations were well accepted, as shown in Figure 3, which stood out regarding great spreadability, skin touch, and hydration, with purchase intentions of 37% for SE, 37% for SE-AAS and 63% for SE-ATIP. The texturometer spreadability results confirmed its sensory predictive nature, since SE and SE-ATIP presented lower work of shear that would indicate better spreadability, according to the verified correlation between both parameters (10,15). On the other hand, the GC formulations did not have good acceptance, with purchase intention between 5 and 11%. In the hardness test, these formulations presented

(Figura 2). As formulações SE e SE-TIPA apresentaram maior estabilidade, e um resultado similar foi obtido em estudo de formulações contendo TIPA, em que veículo e formulação com ingrediente ativo não se diferenciaram com relação aos parâmetros de viscosidade e índice de consistência, além de terem se mantido estáveis durante estudo preliminar com armazenamentos sob temperaturas 25 °C e 45 °C (14).

Houve boa aceitação das formulações de *sérum*, como apresentado na Figura 3, que se destacaram com relação à ótima espalhabilidade, sensação ao toque e hidratação, com intenção de compra de 37% para SE, 37% para SE-AAS e 63% para SE-TIPA. Os resultados de espalhabilidade do texturômetro confirmaram o carácter preditivo de sensorial do equipamento, uma

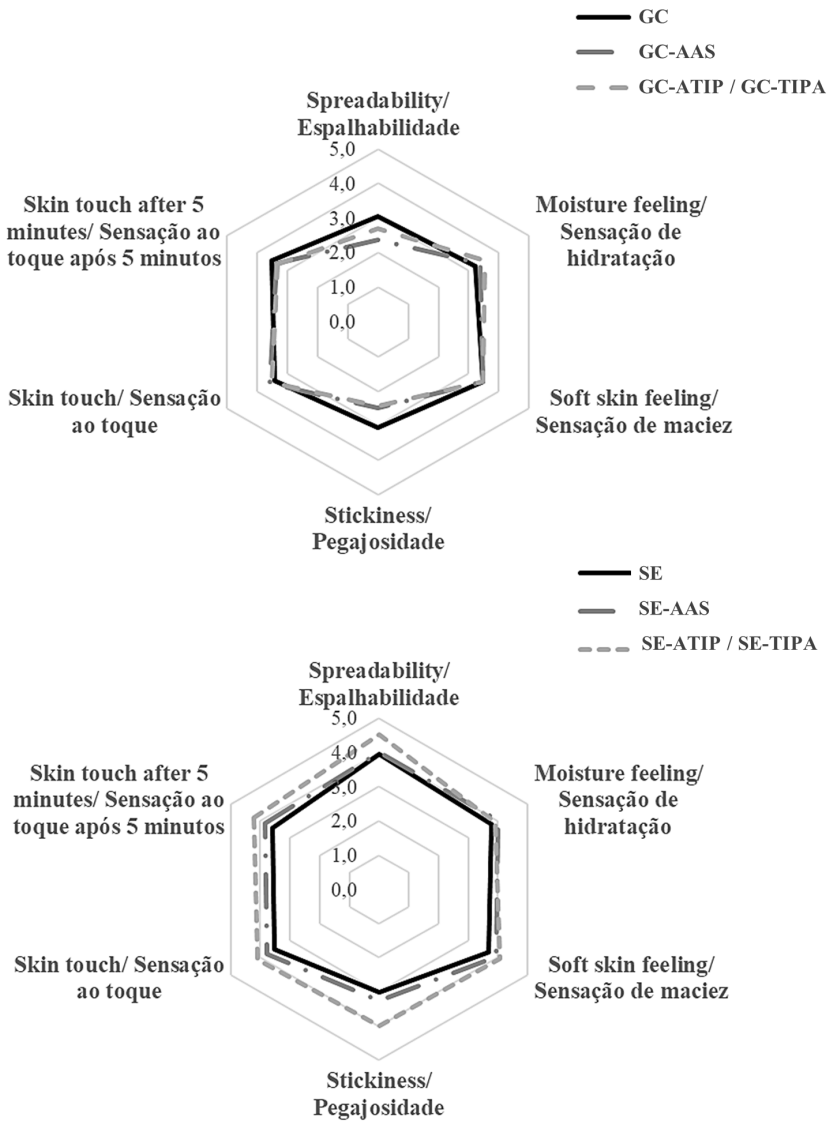


Figure 3 - Results of the sensory analysis of the studied formulations
Figura 3 - Resultados da avaliação sensorial das formulações estudadas

higher values of cohesiveness and stickiness, parameters that most spoiled sensory perception, as they made it difficult to spread and absorb into the skin. Thus, the most viscous formulations had worse spreadability and stickiness, and this was consistent with other research findings (16).

Regarding clinical efficacy testing (Figures 4 and 5), an immediate moisturizing effect was observed on the forearm for all formulations, with higher values of stratum corneum water content for GC, GC-AAS and SE-ATIP. The control region and the malar region of the face remained unchanged. TEWL was reduced in the

vez que SE e SE-TIPA apresentaram baixo trabalho de cisalhamento, indicativos de melhor espalhabilidade, de acordo com a correlação verificada entre os dois parâmetros (10,15). Em contrapartida, os GC não tiveram boa aceitação, com intenção de compra entre 5 e 11%. No teste de dureza, esses apresentaram valores superiores de coesividade e pegajosidade, parâmetros que mais prejudicaram a percepção sensorial, por dificultarem a espalhabilidade e absorção na pele. Com isso, confirmou-se que as formulações mais viscosas apresentaram pior espalhabilidade e pegajosidade, em concordância com outros trabalhos (16).

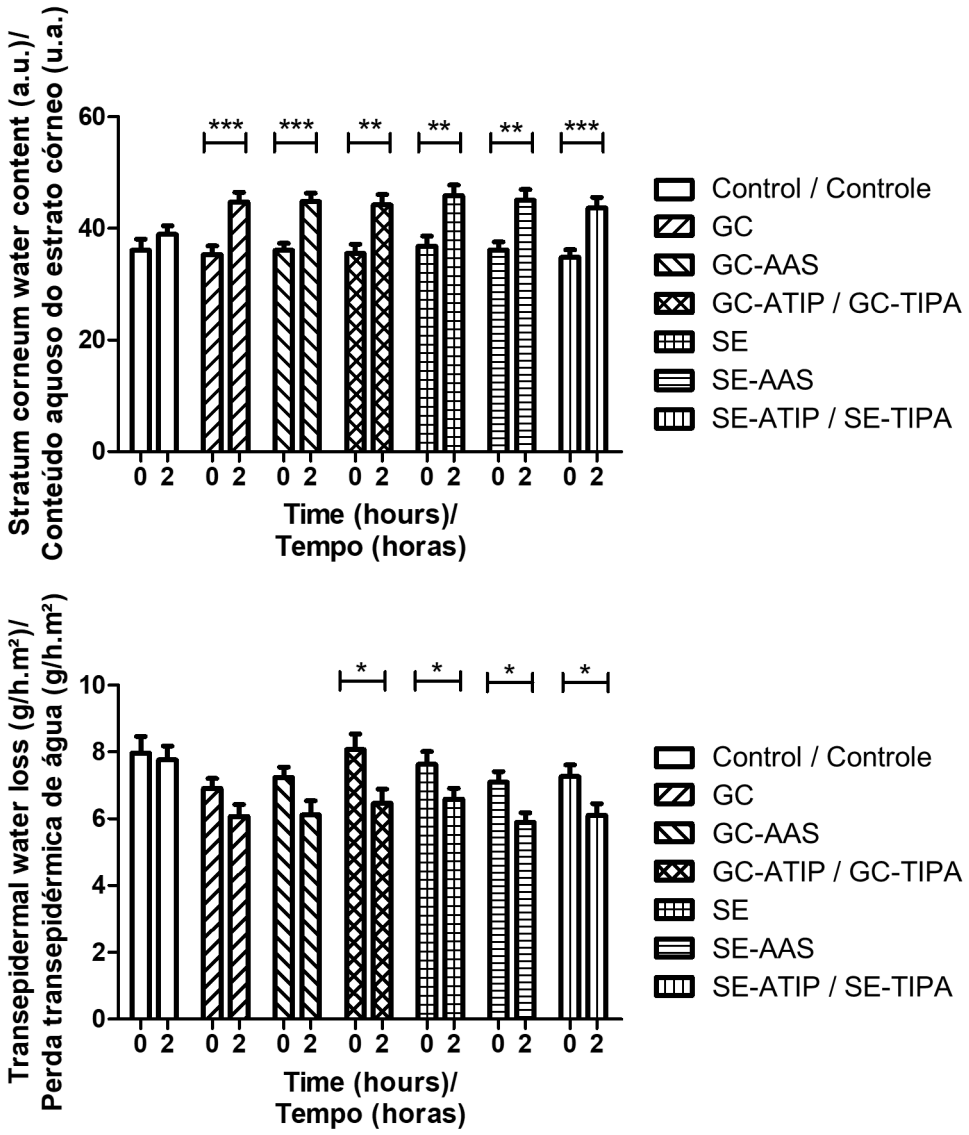


Figure 4 - Results of the clinical efficacy tests (hydration and TEWL) of the studied formulations on forearm areas. The measurements were made before any application (baseline or time 0) and after two hours of applying 20 µL of each formulation in the areas for all nineteen subjects.

Figura 4 - Resultados dos testes clínicos de eficácia (hidratação e TEWL) das formulações estudadas nas áreas do antebraço. As medições foram feitas antes de qualquer aplicação (basal ou tempo 0) e após duas horas de aplicação de 20 µL de cada formulação nas áreas para todas as dezenove participantes.

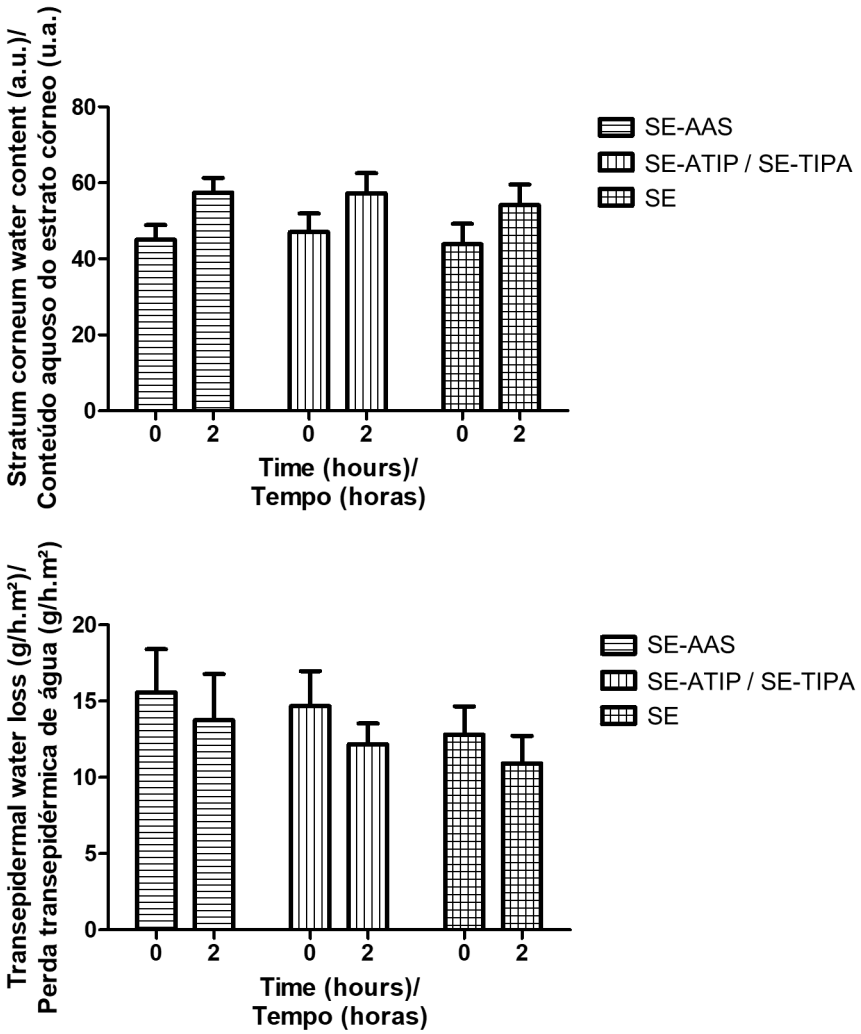


Figure 5 - Results of the clinical efficacy tests (hydration and TEWL) of the studied serums on malar area of the face. The measurements were made before any application (baseline or time 0) and after two hours of applying on the entire face 1 g of the designated formulation, according to the three groups.
Figura 5 - Resultados dos testes clínicos de eficácia (hidratação e TEWL) dos séruns estudados na área malar do rosto. As medições foram feitas antes de qualquer aplicação (basal ou tempo 0) e após duas horas de aplicação no rosto todo de 1 g da formulação determinada, de acordo com os três grupos.

areas of the forearm in which GC-ATIP, SE, SE-AAS and SE-ATIP were applied, but no alterations were noted in the malar region. These different results between the two regions may have occurred due to physiological differences between the areas and also due to much lower basal hydration values in the forearms within the studied group, which could make moisturizing action more pronounced on these areas (17,18). In skin microrelief analysis, no changes were observed in the parameters in any region, due to high interindividual variation. Finally, the serum formulations showed better efficacy, mainly on TEWL reduction.

Nos testes de eficácia clínica (Figuras 4 e 5), observou-se efeito hidratante imediato para todas as formulações, com valores superiores de conteúdo aquoso do estrato córneo para GC, GC-AAS e SE-TIPA. A região controle e a região malar do rosto se mantiveram inalteradas. A TEWL reduziu nas áreas da pele do antebraço em que foram aplicadas GC-TIPA, SE, SE-AAS e SE-TIPA, mas sem alteração na região malar. A diferença de efeitos pode ter ocorrido devido às diferenças fisiológicas entre as regiões estudadas e pelos valores basais de hidratação dentro do grupo estudado terem sido muito inferiores na pele dos antebraços, fazendo com que a ação hidratante tenha sido mais pronunciada nessa região (17,18). Na análise do microrrelevo cutâneo, não foram observadas alterações dos parâmetros

Conclusion

Serum presented better stability and sensory perception, which correlated to physical-mechanical parameters, such as spreadability, and serum with ATIP were evaluated the best because it did not alter formulation's properties. The studied formulations were effective in the immediate hydration and only serums and gel cream containing ATIP reduced TEWL. In summary, serums were the cosmetic form that showed the greatest moisturizing efficacy and preference for study participants.

Acknowledgments

The authors thank CNPq and CNPq-PIBIC (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and scholarships.

Author Contributions

G.B. performed the experimental part of the work and participated in the manuscript writing; G.C. assisted in the definition of the study protocol and in the writing of the manuscript. P.M.C. coordinated the study, defined the study protocol and evaluated and discussed results, supervising writing and approving the final version of the manuscript.

Conflict of interest

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

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

em nenhuma região estudada, em função da alta variação interindividual. Por fim, as formulações *sérum* mostraram melhor eficácia, especialmente na redução da TEWL.

Conclusão

O *sérum* apresentou melhor estabilidade e percepção sensorial, que foi correlacionada aos parâmetros físico-mecânicos, como espalhabilidade, sendo o *sérum* com TIPA melhor avaliado, por não ter alterado as propriedades da formulação. As formulações estudadas foram eficazes na hidratação imediata e somente os *séruns* e o gel creme contendo TIPA reduziram a TEWL. Em síntese, os *séruns* foram a forma cosmética que apresentou maior eficácia hidratante e preferência pelos participantes do estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e CNPq-PIBIC (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e bolsas atribuidas.

Contribuição dos Autores

G.B. realizou a parte experimental do trabalho e participou na redação do manuscrito; G.C. auxiliou na definição do protocolo de estudo e na redação do manuscrito. P.M.C. é a coordenadora do estudo, definiu o protocolo de estudo, avaliou e discutiu os resultados e orientou a redação, aprovando a ultima versão do manuscrito.

Conflito de interesses

O editor senior envolvido na autoria deste manuscrito não teve qualquer participação no processo de revisão ou de decisão.

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

References / Referências

1. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. Journal of Dermatological Science 2010; 58(2): 85-90.
2. Bissett, DL. Common cosmeceuticals. Clinics In Dermatology 2009; 27(5): 435-445.
3. Kim S, Lee TG. Stabilization of l-ascorbic acid in cosmetic emulsions. Journal Of Industrial And Engineering Chemistry 2018; 57: 193-198.
4. Ochiai Y, et al. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. Journal Of Dermatological Science 2006; 44(1): 37-44.
5. Zussman J, Ahdout J, Kim J. Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use? Journal of the American Academy of Dermatology 2010; 63(3): 507-525.
6. Gallarate M, et al. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. International Journal of Pharmaceutics 1999; 188(2): 233-241.
7. Maia Campos PMBG, et al. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2012; 82: 580-586.
8. Shirata, MMF, PMBGM. Importância do perfil de textura e sensorial no desenvolvimento de formulações cosméticas. Surgical And Cosmetic Dermatology 2016; 8(3):223-230.
9. Surini S, Mubarak H, Ramadon D. Cosmetic Serum Containing Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Extract Phytosome: Formulation and in vitro Penetration Study. Jornal of Young Pharmacists 2018; 10(2): 51-55.
10. Calixto LS, Maia Campos PMBG. Physical Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. International Journal of Cosmetic Science 2017; 39: 527-534.
11. Borges CD, Vendruscolo CT. Xanthan Gum: characteristics and operational conditions of production. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde 2008; 29(2): 171-188.
12. Maestro A, González C, Gutiérrez JM. Shear thinning and thixotropy of HMHEC and HEC water solutions. Journal of Rheology 2002; 46(6): 1445-1457.
13. McMillan G, Montgomery R, Wang T. Opportunities for smart wireless pH, conductivity measurements. InTech Magazine (serial online) 2009 Dec [cited 2019 Jun 19]; 1(1): [8 screens]. in: URL: https://www.isa.org/standards-and-publications/isa-publications/intech-magazine/2009/december/web-exclusive-opportunities-for-smart-wireless-ph-conductivity-measurements/
14. Gianeti MD, et al. Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. Molecules 2012; 17(2): 2219-2230.
15. Yilmaz E, Öğütcü M. Comparative analysis of olive oil organogels containing beeswax and sunflower wax with breakfast margarine. Journal of Food Science 2014; 79(9): 1732-1738.
16. Lukic M, et al. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. International Journal of Cosmetic Science 2012; 34(2): 140–149.
17. Paseto TR, Wagemaker TAL, Maia Campos PMBG. Immediate and long term effects of a cosmetic formulation with Cichorium intybus root extract. Biomedical and Biopharmaceutical Research 2017; 14(2): 220-232.
18. Tončić RJ, et al. Skin barrier and dry skin in the mature patient. Clinics In Dermatology 2018; 36(2): 109-115.

.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.,* 2020; 17(1): 102-118

doi: 10.19277/bbr.17.1.224

Development and evaluation of physico-chemical stability of cosmetic formulations employing the fruits of the Jussara palm tree (*Euterpe edulis* Martius): tinting shampoo and exfoliant cream

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade fisico-química de formulações cosméticas utilizando os frutos da palmeira Jussara (Euterpe edulis Martius): shampoo matizante e creme esfoliante

Henriette Marcondes Fonseca de Marcos [1], Laura Isabella Lopes Favaro [1], Lilian Katsue Harada [1], Matthieu Tubino [2], Valquíria Miwa Hanai Yoshida [1], Victor Manuel Balcão [1,3], Marta Maria Duarte Carvalho Vila [1]

[1]PhageLab – Laboratory of Biofilms and Bacteriophages, University of Sorocaba, 18023-000 Sorocaba/SP, Brazil; [2]Institute of Chemistry, State University of Campinas, Campinas/SP, Brazil; [3]Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

* Corresponding author: marta.vila@prof.uniso.br

Abstract

The major goal of this research work was to use the dry extract of the fruits of Jussara palm tree (*Euterpe edulis* Martius) in the development of a tinting shampoo (0.3% (w/v) anthocyanin extract) and an exfoliating beauty cream integrating granules from the seeds of the fruit (1%, w/v). The dry extract was characterized via determination of the content of anthocyanins by the differential pH method, antioxidant activity by the phospho-molybdenum complex methodology, and antimicrobial activity by the disc-diffusion method. The extraction yield was 2.3% (w/w) (2.25 g dry extract/100 g fruit), with an antioxidant activity of 139.0 ± 5.5% relative to that of ascorbic acid, indicating a high antioxidant capacity. The anthocyanin extract did not exhibit antimicrobial activity. The physico-chemical stability characteristics of both the tinting shampoo and the exfoliating cream were evaluated via accelerated stability studies at 0, 30, 60 and 90 days of storage at 40 ± 2 °C and 75 ± 5% relative humidity. The cosmetic products prepared were stable in relation to the physico-chemical characteristics under the conditions studied.

Keywords: Jussara; *Euterpe edulis* Martius; anthocyanins; tinting shampoo; exfoliating cream

Resumo

O principal objetivo deste trabalho de investigação consistiu em utilizar o extrato seco dos frutos da palmeira Jussara (*Euterpe edulis* Martius) no desenvolvimento de um shampoo matizante (0,3% (m/v) de extrato antocianínico) e de um creme de beleza esfoliante integrando grânulos das sementes do fruto (1%, m/v). O extrato seco foi caracterizado através da determinação do teor em antocianinas pelo método do pH diferencial, a atividade antioxidante pelo método do complexo fosfo-molibdénio e a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão. O rendimento de extração foi de 2,3% (m/m) (2,25 g extrato seco/100 g fruto), com uma atividade antioxidante de 139,0 ± 5,5% relativamente àquela do ácido ascórbico, indicando uma alta capacidade antioxidante. O extrato antocianínico não exibiu atividade antimicrobiana. As características de estabilidade físico-química tanto do shampoo matizante como do creme esfoliante foram avaliadas por ensaios de estabilidade acelerada aos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 40 ± 2 °C e 75 ± 5% de humidade relativa. Os produtos cosméticos preparados foram estáveis em relação às caracterisiticas físico-quimicas nas condições estudadas.

Palavras-chave: Jussara; *Euterpe edulis* Martius; antocianinas; shampoo matizante; creme exfoliante

Received / *Recebido*: 22/05/2019
Accepted / *Aceite*: 17/02/2020
Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

The use of raw materials of plant origin in cosmetic products is a promising trend in the cosmetics industry, as consumers are increasingly looking for products that take advantage of the benefits that nature provides. The use of plant extracts in cosmetics has been highlighted by consumer demand, who are increasingly concerned with buying ecologically friendly products (1). In contrast to cosmetic ingredients of a synthetic nature, plant products are generally mild and biodegradable, exhibiting low toxicity (1-3). The aim of this research study was to evaluate the use of extracts from plant sources in different types of cosmetics, as a function of several interesting properties (3-5) such as antioxidant and antimicrobial activities, tyrosinase inhibition effect (1), and inhibition of the harmful effects of UVA radiation (4,5), among other properties.

The fruit of the Jussara palm is considered an excellent source of anthocyanins, with anthocyanins being considered the most important group of water-soluble natural dyes, responsible for red, orange, pink, violet, blue, and purple colors in most flowers and fruits (6,7). These bioactive molecules are water-soluble glycosides belonging to the flavonoid class and are derived from the flavylium cation or 2-phenylbenzopyrilium (8). Anthocyanins exhibit great potential for application in foods, pharmaceutical products and cosmetics, due to their wide range of colors, atoxicity, and beneficial effects on health (9). Anthocyanins are being studied for their high antioxidant capacity (3,10), photoprotective efficacy (4), and coloring ability (11).

Cosmetics with the purpose of changing hair color, such as hair dye products, are used with high frequency. According to the durability of the color following hair dye application on hair strands, hair dying systems can be divided into temporary, semi-permanent, demi-permanent and permanent (12). Natural pigments such as anthocyanins can be used in temporary stain applications, as in the process known as tinting. Temporary coloration is not effective in covering gray or white hair because the pigment only reaches the cuticle. These products sometimes are used to add shine and make the natural hair color more vibrant (13).

Another possible and interesting use of raw by-products from fruits involves the seeds, aiming at obtaining natural exfoliants. The seeds of the fruit of the Jussara palm can also be used for this purpose, since exfoliants of synthetic origin are proving to be potent environmental contaminants. Microplastics have accumulated in the oceans and marine sediments around the world in recent years, with maximum concentrations reach-

Introdução

A utilização de matérias-primas de origem vegetal em produtos cosméticos é uma tendência promissora na indústria de cosméticos, uma vez que os consumidores procuram cada vez mais produtos que tirem partido dos benefícios que a natureza proporciona. O uso de extratos vegetais em cosméticos tem se destacado pela demanda do consumidor, que se preocupa cada vez mais em comprar produtos ecologicamente corretos (1). Em contraste com os ingredientes cosméticos de natureza sintética, os produtos à base de plantas são geralmente mais suaves ebiodegradáveis, exibindo uma baixa toxicidade (1-3). O objetivo deste trabalho de investigação consistiu em avaliar a utilização de extractos de fontes vegetais em diferentes tipos de produtoscosméticos, em função de diversas propriedades interessantes (3-5) tais como atividades antioxidante e antimicrobiana, efeito inibidor da tirosinase (1), inibição dos efeitos prejudiciais dos raios UVA (4,5), entre outras propriedades.

O fruto da palmeira Jussara é considerado uma excelente fonte de antocianinas, sendo estes pigmentos considerados o mais importante grupo de corantes naturais solúveis em água, responsáveis pelas cores vermelha, laranja, rosa, violeta, azul e roxa na maior parte das flores e frutos (6,7). Estas moléculas bioativas são glicosídeos solúveis em água que pertencem à classe dos flavonóides e são derivados do catião flavilium ou 2-fenilbenzopirilium (8).

As antocininas exibem grande potencial de aplicação em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, devido à sua ampla gama de cores, atoxicidade e efeitos benéficos para a saúde (9). As antocianinas estão a ser estudadas devido à sua elevada capacidade antioxidade (3,10), eficácia fotoprotetora (4) e capacidade colorante (11).

O uso de cosméticos com o objetivo de mudar a cor do cabelo, tais como produtos de coloração capilar, ocorre com elevada frequência. De acordo com a durabilidade da cor após aplicação de produtos de coloração capilar em mechas de cabelo, os sistemas de coloração podem ser divididos em temporário, semipermanente e permanente (12). Pigmentos naturais tais como as antocianinas podem ser utilizados em aplicações de coloração temporária, como no processo conhecido como matização. A coloração temporária não é tão eficaz em cobrir cabelos grisalhos ou brancos, porque o pigmento apenas alcança a cutícula. Por vezes, estes produtos são utilizados para conferir brilho e tornar a cor natural do cabelo num tom mais vibrante (13).

Outro possível e interessante uso de matérias-primas residuais provenientes de frutos envolve as sementes,

ing 100000 particles per cubic meter. Because of their very small size, microplastics can be ingested by low trophic fauna, with consequences still unknown to the health of the organisms and the entire marine trophic chain (14). Microspheres obtained from synthetic polymers are used in hundreds of products, such as abrasives (including cosmetics intended for face and body wash), cleansers, moisturizers, and exfoliants, among others. Approximately 6% of liquid soaps and commercially available shower gels in Europe include plastic microspheres (15). The scientific evidence that points to the seriousness of environmental contamination by (micro) plastics have led some multinational companies to commit to eliminating these types of materials from their products by 2020 (16,17).

In this sense, it is important to develop products or substances that are viable alternatives to synthetic exfoliants, for use as abrasives in cosmetics, with characteristics that are less aggressive to the environment, such as seed-based scrubs. Hence, the use of the Jussara fruit pulp residue as an exfoliating raw material for use in cosmetics can be quite interesting both from ecological and commercial points of view, leading to a complete valorization of this fruit and avoiding the generation of environmentally contaminating residues.

Due to the facts mentioned above, the present research work finds justification in the development of a tinting shampoo containing extract of anthocyanins and an exfoliating beauty cream incorporating granules derived from the seeds of the Jussara palm tree fruit (*Euterpe edulis* Martius).

Material and Methods

Materials

The fruits of Jussara palm tree (*Euterpe edulis* Martius) were a kind gift by Floricultura Campineira (Campinas, SP, Brazil), with its cultivation located in Jaguaruína (SP, Brazil). The fruits were stored under freezing conditions (-18 °C) throughout the experiments. For the shampoo tint test, locks of blond human hair were purchased from the specialized company Lika Hair (Sorocaba, SP, Brazil). All the reagents used were of

com o objetivo de obter esfoliantes naturais. As sementes do fruto da palmeira Jussara podem assim ser também utilizadas com este objetivo, uma vez que os esfoliantes de origem sintética têm-se revelado potentes contaminantes ambientais. Os microplásticos têm-se acumulado nos oceanos e nos sedimentos marinhos por todo o mundo nos últimos anos, com concentrações máximas a atingirem 100000 partículas por metro cúbico. Devido ao seu tamanho diminuto, os microplásticos podem ser ingeridos pela fauna trófica baixa, com consequências ainda desconhecidas para a saúde dos organismos e de toda a cadeia trófica marinha (14). As microesferas obtidas a partir de polímeros sintéticos são utilizadas em centenas de produtos, tais como abrasivos (incluindo cosméticos destinados à lavagem facial e lavagem corporal), produtos de limpeza, hidratantes, esfoliantes, entre outros. Cerca de 6% dos sabonetes líquidos e géis para banho disponíveis comercialmente na Europa têm adição de microesferas de plástico (15). A evidência científica que aponta para a gravidade da contaminação ambiental por (micro) plásticos tem levado algumas empresas multinacionais a comprometerem-se a eliminar estes tipos de materiais dos seus produtos até 2020 (16,17).

Neste sentido, é importante o desenvolvimento de produtos ou substâncias que sejam alternativas viáveis aos esfoliantes sintéticos, para utilização como abrasivos em cosméticos, com características menos agressivas para o meio ambiente, tais como os esfoliantes oriúndos de sementes. Assim, a utilização do resíduo da polpa do fruto da Jussara como matéria-prima esfoliante para utilização em cosméticos pode ser bastante interessante, tanto do ponto de vista ecológico, como do ponto de vista comercial, levando à completa valorização deste fruto e evitando a geração de resíduos contaminantes do meio ambiente.

Devido aos fatos supramencionados, o presente trabalho de investigação encontra justificação no desenvolvimento de um shampoo matizante contendo extrato antocianínico e de um creme de beleza esfoliante incorporando grânulos derivados das semente do fruto da palmeira Jussara (*Euterpe edulis* Martius).

Material e Métodos

Materiais

Os frutos da palmeira Jussara (*Euterpe edulis* Martius) foram gentilmente cedidos pela Floricultura Campineira (Campinas, SP, Brasil), sendo proveniente da sua estação de cultivo localizada em Jaguaríuna (SP, Brasil). Os frutos foram armazenados sob condições

Table 1 - The composition of body exfoliation cream formulation
Tabela 1 Composição da formulação de creme esfoliante corporal

INCI* Nomenclature / Nomenclatura INCI*	Function/ Função	Commercial name / Nome comercial	% (w/w) % (m/m)
OILY PHASE / FASE OLEOSA			
Helianthus annuus (Sunflower) SEED OIL + XYLITOL SESQUICAPRYLATE + GLYCERYL STEARATE + *Eurphobia cerifera* (Candelilla) WAX + SODIUM HYDROXIDE	Thickener and emulsifying agent / Agente espessante e emulsificante	Emulfeel SGP / Emulfeel SGP	5.00
PARAFFINUM LIQUIDUM	Emollient fatty acid / Ácido gordo emoliente	Mineral oil / Óleo mineral	6.00
METHYLPARABEN	Anti-fungal agent / Agente antifúngico	Methylparaben Nipagin® / Metilparabeno Nipagin®	0.18
PROPYLPARABEN	Anti-fungal agent / Agente antifúngico	Propylparaben Nipazol® / Propilparabeno Nipazol®	0.02
Euterpe edulis SEED POWDER	Exfoliant / Esfoliante		1.00
PROPYLENE GLYCOL	Humectant / Humectante	Propylene glycol / Propilenoglicol	4.00
FRUIT EXTRACT	Fragrance / Perfume	Essence / Essência	0.50
AQUEOUS PHASE / FASE AQUOSA			
DISODIUM EDTA	Chelating agent and viscosity controller/ Agente quelante e controlador de viscosidade	EDTA	0.10
WATER/ ÁGUA	Solvent / Solvente	Deionized water / Água desionizada	**q.s.p. 100

Table 2 - Formulation of shading shampoo for white, blond and discolored hair
Tabela 2 - Formulação de shampoo matizante para cabelos brancos, loiros e descolorados

INCI* Nomenclature / Nomenclatura INCI*	Function/ Função	Commercial name / Nome comercial	% (w/w) % (m/m)
PRESERVATIVE PHASE / FASE CONSERVANTE			
PROPYLENE GLYCOL	Moisturizing / Humectante	Propylene glycol / Propilenoglicol	5.00
METHYLPARABEN	Anti-fungal agente / Agente antifúngico	Methylparaben / Metilparabeno	0.18
PROPYLPARABEN	Anti-fungal agent / Agente antifúngico	Propylparaben / Propilparabeno	0.02
PROPYLPARABEN	Anti-fungal agent / Agente antifúngico	Propylparaben Nipazol® / Propilparabeno Nipazol®	0.02
WATER PHASE AND SURFACTANTS / FASE AQUOSA E TENSIOATIVOS			
SODIUM LAURYL ETHER SULFATE	Anionic Surfactant / Tensioativo aniónico	Sodium lauryl ether sulfate / Lauril éter sulfato de sódio	25.00
COCAMIDE DEA (SYNOTOL CN 90)	Emulsifying agent / Agente emulsificante	Cocamide Dea (Synotol CN 90) / Dietanolamida de ácido gordo de coco 90	3.50
WATER / ÁGUA	Solvent / Solvente	Deionized water / Água desionizada	**q.s.p. 100
EXTRACT AND FRAGRANCE / EXTRATO E ESSÊNCIA			
FRUIT EXTRACT	Fragrance / Perfume	Essence / Essência	0.50
Euterpe edulis FRUITS EXTRACT	Antioxidant and color donor / Antioxidante e colorante	Colorant / Colorante	0.3%
pH ADJUSTMENT / CORREÇÃO DO pH			
TRIETHANOLAMINE	Basifying / Basificante	Triethanolamine 20% / Trietanolamina 20%	q.s.p. pH 6
CITRIC ACID	Acidulant / Acidificante	Citric Acid / Ácido cítrico	q.s.p. pH 6
GELIFYING AGENT / GELIFICANTE			
HYDROXYETHYLCELLULOSE	Thickener / Espessante	Hydroxyethylcellulose (Natrosol®) / Hidroxietilcelulose (Natrosol®)	1.00

* International Nomenclature of Cosmetic Ingredients / * Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos;
**q.s.p. = quantity sufficient per / ** q.s.p.= quantidade suficiente para

pro-analysis (PA) grade and the water used was purified in a Milli-Q® system until a final conductivity of 18.2 MΩ.cm^{-1}. All components used in the preparation of cosmetics were of pharmaceutical grade and were either purchased from specialized distributors or kindly donated by Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brazil). The formulations used in the preparation of the cosmetics are detailed in Tables 1 and 2.

Methods

The first part of the experimental work was focused on obtaining and characterizing the anthocyanin extract produced from the fruits of the Jussara palm tree. After the extraction process, the exfoliating granules were prepared from the anthocyanin extraction residues (fruit seeds) and duly characterized. The second part of the experimental work was focused on developing and characterizing the cosmetic formulations (tinting shampoo and exfoliating cream) and the determination of their physical-chemical stability.

Preparation of anthocyanin extracts

The anthocyanin extraction process was performed according to the procedure described by Favaro et al. (18). The anthocyanin extraction was made by combining the Jussara fruit pulp with 94% ethanol (solvent) in a 1:3 ratio (fruit:solvent, w/v). The first step of the process consisted of manually removing the pulp from the Jussara fruit with a knife. The pulp obtained was weighed and the solvent added. The solution was placed in a thermostated bath set at 55 °C (Novatécnica, model NT 230, Piracicaba, SP, Brazil) for the extraction of anthocyanins. After 30 min, the macerate was filtered on qualitative filter paper to obtain the liquid extract. The extract was then dried in a fume hood with air circulation for approximately 6 h, in the absence of light. The dried extract was then stored in a polyethylene flask wrapped with aluminium foil for protection from light, under freezing conditions (-18 ºC).

Quantification of anthocyanins in the extract

The spectrophotometric differential pH method was used to quantify the anthocyanins present in the dry extract (19). Absorbance readings of the samples were performed at the wavelengths of 520 nm and 700 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Multispec, model 1501, Shimadzu, Tokyo, Japan). The anthocyanin content

de congelação (-18 °C) durante todo o procedimento experimental. Para o teste de matização do shampoo foram utilizadas mechas de cabelos loiros de origem humana adquiridas à empresa especializada Lika Hair (Sorocaba, SP, 33). Todos os reagentes utilizados foram de grau pró-análise (PA) e a água utilizada foi purificada num sistema Milli-Q® até uma condutividade final de 18.2 MΩ.cm^{-1}. Todos os componentes utilizados na preparação dos cosméticos foram de grau farmacêutico, tendo sido ou adquiridos em distribuidoras especializadas ou gentilmente cedidos pela empresa Chemyunion Química Ltda (Sorocaba,SP, Brasil). As formulações utilizadas na preparação dos cosméticos podem ser encontradas nas Tabelas 1 e 2.

Métodos

A primeira parte do trabalho experimental focou-se na obtenção e caracterização de um extrato de antocianinas produzido a partir dos frutos da palmeira Jussara. Após o processo de extração, os grânulos esfoliantes foram preparados a partir dos resíduos da extração das antocianinas (sementes dos frutos) e devidamente caracterizados. A segunda parte do trabalho experimental focou-se no desenvolvimento e determinação da estabilidade físico-química de formulações cosméticas (shampoo matizante e creme de beleza esfoliante).

Preparação dos extratos antocianínicos

O processo de extração das antocianinas foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Favaro et al. (18). A extração das antocianinas foi feita adicionando a polpa dos frutos da Jussara com solvente na proporção 1:3 (fruta:solvente, m/v), utilizando-se como solvente uma solução de etanol 94% . A primeira etapa do processo consistiu na remoção manual da polpa do fruto da Jussara com auxílio de uma faca. A polpa assim obtida foi pesada e adicionado o solvente. Esta solução foi colocada em banho termostatizado a 55 °C (Novatécnica, modelo NT 230, Piracicaba, SP, Brasil) para extração das antocianinas. Após 30 min, o macerado foi filtrado em papel de filtro qualitativo por forma a obter o extrato húmido. Este extrato húmido foi então seco numa hotte com circulação de ar durante aproximadamente 6 h, na ausência de luz. O extrato seco foi depois armazenadonum frasco de polietileno envolvido por folha de alumínio para proteção contra a luz, sob condições de congelação (-18 ºC).

Quantificação das antocianinas no extrato

O método utilizado para quantificar as antocianinas presentes no extrato seco foi o método espectrofotométrico do pH diferencial (19). As leituras de absorvância das

was calculated as cyanidin-3-glycoside (MW = 449.2 g/mol) equivalent, using Equation 1.

$$C\left(\frac{mg\ anthocyanin}{100\ g\ fruit}\right) = \frac{((A_{510nm}-A_{700nm})_{pH\ 1.0}-(A_{510nm}-A_{700nm})_{pH\ 4.5})\cdot MW\cdot DF}{\varepsilon\cdot 1} \quad \textbf{(Eq. 1)}$$

where A is absorbance, Ɛ is the molar absorptivity (26900 mol.dm^{1vg}), DF is the dilution factor, MW is the molecular weight of cyanidin-3-glycoside, and 1 is the thickness of the cuvette (cm).

Antioxidant activity of the extract

The antioxidant activity was determined by the phospho-molybdenum complex method, which is based on the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) in the presence of a substance with antioxidant capacity (20). The percentage of antioxidant activity (% AA) was calculated using Equation 2.

$$\%AA = \frac{A_{sample}-A_{blank}}{A_{ascorbic\ acid}-A_{blank}}\times 100 \quad \textbf{(Eq. 2)}$$

where A_{sample} is the absorbance of the sample, A_{blank} is the absorbance of the blank, and $A_{ascorbic\ acid}$ is the absorbance of ascorbic acid.

Antimicrobial activity of the extract

The antimicrobial activity of the Jussara extract was determined by the antimicrobial susceptibility test using the disc-diffusion technique (21). The bacterial strains used were Staphylococcus aureus (CCCD-S007), Pseudomonas aeruginosa (CCCD-P004) and Escherichia coli (CCCD-E003) (Cefar Diagnostica Culture Collection, São Paulo, Brazil). The culture medium was TSA (Trypticase Soy Agar) from Fluka (St. Louis MO, USA). Ultrapure water was used as a negative control, and penicillin/streptomycin (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil) was used as a positive control.

Preparation of the exfoliating agent from the seeds of the Jussara fruit

The seeds were separated, washed with ultrapure water and dried in an incubating chamber (Fanem, model 515, Guarulhos, Brazil) at 100 °C for 24 h. The dried residue was then milled in a Willey knife mill (Marconi, model MA340, Piracicaba, Brazil) and the powder obtained was graded to determine the size of the granules produced.

amostras foram realizadas aos comprimentos de onda de 520 nm e 700 nm num espectrofotômetro UV-Vis (Multispec, modelo 1501, Shimadzu, Tóquio, Japão). O teor em antocianinas foi calculado como equivalente da cianidina-3-glicosídeo (MM = 449,2 g/mol),utilizando-se a Equação 1.

$$C\left(\frac{mg\ anthocyanin}{100\ g\ fruit}\right) = \frac{((A_{510nm}-A_{700nm})_{pH\ 1.0}-(A_{510nm}-A_{700nm})_{pH\ 4.5})\cdot MW\cdot DF}{\varepsilon\cdot 1} \quad \textbf{(Eq. 1)}$$

onde A é a absorvância, Ɛ é a absortividade molar (26900 mol.dm^{-3}), DF é o fator de diluição, MM é a massa molecular da cianidina-3-glicosídeo; e 1 é a espessura da cuvete (cm).

Atividade antioxidante do extrato

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do complexo fosfomolibdénio, o qual é baseado na redução do molibdénio (VI) a molibdénio (V) na presença de uma substância com capacidade antioxidante (20). A percentagem de atividade antioxidante (% AA) foi calculada utilizando a Equação 2.

$$\%AA = \frac{A_{amostra}-A_{branco}}{A_{ácido\ ascórbico}-A_{branco}}\times 100 \quad \textbf{(Eq. 2)}$$

onde $A_{amostra}$ é a absorvância da amostra, A_{branco} é a absorvância do branco, e $A_{ácido\ ascórbico}$ é a absorvância do ácido ascórbico.

Atividade antimicrobiana do extrato

A atividade antimicrobiana do extrato de Jussara foi determinada pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos, utilizando a técnica de disco-difusão (21). As estirpes bacterianas utilizadas foram Staphylococcus aureus (CCCD-S007), Pseudomonas aeruginosa (CCCD-P004) e Escherichia coli (CCCD-E003) (Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil). O meio de cultura utilizado foi o TSA (Trypticase Soy Agar) da marca Fluka (St. Louis, MO, EUA). Como controle negativo utilizou-se água ultrapura e como controle positivo utilizou-se penicilina/estreptomicina (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil).

Preparação do agente esfoliante a partir das sementes do fruto da Jussara

As sementes foram separadas, lavadas com água ultrapura e secas em estufa (Fanem, modelo 515, Guarulhos, Brasil) a 100 ºC durante 24 h. O resíduo seco foi então triturado em moinho de facas do tipo Willey (Marconi, modelo MA340, Piracicaba, Brasil) e o pó obtido foi tamizado visando determinar o tamanho dos grânulos produzidos.

Determination of the granulometry of the exfoliating agent

The granulometry of the exfoliating agent was determined by sieving, using an electromagnetic sieve agitator for granulometric analysis (Bertel, Caieiras, Brazil). Approximately 100 g of sample were poured in the highest granulation sieve and the sieve stack was shaken at 60 vibrations per second for 15 min. The amount of powder remaining in each sieve was determined, and Equation 3 was used to calculate the mean particle size (mm) (22).

$$d = \frac{\sum(\%retained)x(average\ aperture)}{100} \qquad \textbf{(Eq. 3)}$$

where d is the average diameter (mm), % retained is the percentage fraction retained on each sieve, and average aperture is the average aperture of the mesh (mm) in each granulometric class.

Density of granules

The density of the granules was determined by pycnometry, using a helium pycnometer from Quantachromed Instruments (model Ultrapyc 1200e, Boynton Beach, FL, USA).

Scanning electron microscopy

The surface microstructure of the granules was observed in a Scanning Electron Microscope (SEM) from JEOL (model JSM-63660, Tokyo, Japan).

Preparation of cosmetic products

Preparation of cosmetics (shading shampoo and body exfoliating cream) followed the Good Manufacturing and Control Practices established by Resolution of Directors Collective (RDC) 67/2017 of Anvisa (Brazilian National Health Surveillance Agency) (23).

The shampoo was prepared in a 100 mL beaker by dissolving propylene glycol, methyl paraben, and propyl parabenin deionized water, followed by heating to 70 °C. This was called the preservative phase. Afterward, in another 100 mL beaker, lauryl sulfate and coconut fatty acid diethylamide were homogenized with cold deionized water at 300 rpm. This was the surfactant phase. The two phases (preservative and surfactant) were then mixed in another beaker and duly homogenized using a magnetic stirrer at 300 rpm. The pH was corrected to 6.0 via the dropwise addition of citric acid or triethanolamine. A 30% (w/w) NaCl solution was then dripped into the solution until the desired viscosity was reached, evaluated by the physical appearance of the shampoo. Afterward, natrosol was sprayed onto

Determinação da granulometria do agente esfoliante

A granulometria do agente esfoliante foi determinada pelo método da tamização, utilizando um agitador electromagnético de peneiras para análises granulométricas (Bertel, Caieiras, Brasil). Cerca de 100 g de amostra foram colocadas no tamis de maior granulação e em seguida a pilha de tamizes foi agitada a 60 vibrações por segundo durante 15 min. Determinou-se a quantidade de pó restante em cada tamis e, para o cálculo do tamanho médio das partículas (mm), utilizou-se a Equação 3 (22).

$$d = \frac{\sum(\%retida)x(abertura\ média)}{100} \qquad \textbf{(Eq. 3)}$$

onde d é o diâmetro médio (mm), % retida é a percentagem da fração retida em cada tamis, e abertura média é a abertura média da malha (mm) em cada classe granulométrica.

Densidade dos grânulos

A densidade dos grânulos foi determinada por picnometria, utilizando-se um picnómetro de hélio da marca Quantachrome Instruments (modelo Ultrapyc 1200e, Boynton Beach, FL, EUA).

Microscopia eletrónica de varrimento

A microestrutura de superfície dos grânulos foi observada num Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV) da marca JEOL (modelo JSM-63660, Tóquio, Japão).

Preparação dos produtos cosméticos

A preparação dos produtos cosméticos (shampoo matizante e creme esfoliante corporal) seguiu as Boas Práticas de Fabricação e Controle estabelecidas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 67/2007 da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil) (23).

O shampoo foi preparado num gobelé de 100 mL, através da adição de propilenoglicol, metilparabeno e propilparabeno, e dissolução em água deionizada, seguido de aquecimento a 70 ºC. Esta fase foi denominada fase conservante. De seguida, num outro gobelé de 100 mL, os tensioativos lauril sulfato de sódio e dietilamida de ácidos gordos de coco foram dissolvidos a frio em água desionizada com homogeneização magnética a 300 rpm. Esta fase foi denominada de fase surfactante. As duas fases (conservante e surfactante) foram misturadas num outro gobelé e devidamente homogeneizadas por agitação magnética a 300 rpm. O pH foi corrigido para 6,0 por adição de gotas de acido cítrico ou trietanolamina. Em seguida, uma solução de NaCl a 30% (m/m) foi

the shampoo, which was gently homogenized by hand to prevent foaming. Finally, the Jussara extract was added in a 0.3% (w/w) ratio and the formulation was homogenized by gentle stirring (24). Tests with 0.2, 0.3 and 0.4% (w/v) anthocyanin extract were performed in order to determine the best shading effect for the shampoo. Colour fixation analysis was performed using locks of blond human hair. The locks were manually cleaned with neutral shampoo (5 mL) and immediately washed with shading shampoos (5 mL) containing different anthocyanin concentrations.

The exfoliating beauty cream was initially prepared by separately heating all components of the oil phase to the melting point of solid fatty substances (ca. 70 °C). The aqueous phase components were heated to 75 °C and then slowly added to the oil phase with manual stirring until cooled to room temperature (25 °C). Subsequently, the seed granules (previously hydrated) were added at a ratio of 1% (w/v) of the total volume of the formulation. The samples were stored in polyethylene containers at room temperature (25 ºC) under light protection until the execution of the preliminary stability and accelerated stability tests.

Physical-chemical stability tests

Preliminary stability tests (freeze-thaw cycle, centrifugation test, and thermal stress) were performed 24 h after the preparation of the cosmetic products. Following, the samples were stored either at room temperature (25 ± 2 °C) or in an incubating chamber (40 ± 2 °C and 75 ± 5% relative humidity (RH)) and subjected to the accelerated stability test at 0, 30, 60 and 90 days of storage. For the body exfoliating cream, the organoleptic characteristics, pH, viscosity and scatter ability tests were also performed, while for the shading shampoo the organoleptic characteristics, pH and relative density tests were performed (25).

gotejada até se atingir a viscosidade desejada determinada pela aparência física do shampoo. Na sequência, pulverizou-se natrosol sobre o shampoo que foi então suavemente homogeneizado manualmente por forma a evitar a formação de espuma. Finalmente, o extrato de Jussara foi adicionado na proporção de 0,3% (m/m) e a formulação foi homogeneizada por agitação suave (24). Foram realizados ensaios com concentrações mássicas de extrato antocianínico de 0,2, 0,3 e 0,4% (m/v), de modo a determinar o melhor efeito matizante para o shampoo. A análise da fixação de cor foi realizada utilizando-se mechas de cabelos loiros de origem humana. As mechas foram manualmente higienizadas com shampoo neutro (5 mL) e imediatamente lavadas com os shampoos matizantes (5 mL) contendo diferentes concentrações de antocianina.

O creme esfoliante foi inicialmente preparado aquecendo-se, separadamente, todos os componentes da fase oleosa até ao ponto de fusão das substâncias gordas sólidas (cerca de 70 °C). Os componentes da fase aquosa foram aquecidos a 75 °C e depois lentamente adicionados à fase oleosa sob agitação manual, até arrefecimento à temperatura ambiente (25 °C). Subsequentemente, os grânulos das sementes (previamente hidratados) foram adicionados na proporção de 1% (m/v) em relação ao volume total da formulação. As amostras foram armazenadas em recipientes de polietileno, mantidas em temperatura ambiente (25 ºC) sob proteção da luz até a realização dosdos testes de estabilidade preliminar e acelerada.

Ensaios de estabilidade físico-química

Após a preparação dos produtos cosméticos (24 h), realizaram-se os ensaios de estabilidade preliminar (ciclo de congelação-descongelação, teste de centrifugação e stress térmico). Na sequência, as amostras foram armazenadas tanto à temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) como em estufa (40 ± 2 °C e 75 ± 5% de umidade relativa (UR)), e sujeitas ao teste de estabilidade acelerada após 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Para o creme esfoliante corporal, realizaram-se também os ensaios de características organolépticas, pH, viscosidade e espalhabilidade, enquanto que para o shampoo matizante foram realizados os ensaios de características organolépticas, pH e densidade relativa (25).

Results and Discussion

Characterization of dry anthocyanin extract

The most commonly used solvents for anthocyanin extraction from fruits are aqueous mixtures of ethanol, methanol, or acetone. Extraction with methanol is the most efficient, but ethanol is preferred due to its much lower toxicity (9). The use of hydroalcoholic solutions varies from 50% to 95% (v/v) in several extraction processes. (7,24,26) The yield of the extraction process was 2.3% (w/w) (2.25 g dry extract/100 g fruit) and could be considered efficient. The total concentration of anthocyanins in the extract was 1.09 ± 0.10 g / 100 g pulp, so Jussara fruits proved to be a good source of this pigment. However, the evaluation of these parameters should also consider the degree of maturation of the fruit and the geographic location of the plant source, among other factors (25,27).

The antioxidant activity of the anthocyanin extract obtained from the fruit of Jussara was 139.0 ± 5.5% in relation to the ascorbic acid, indicating a high antioxidant capacity of the extract. This property has been observed in other reported works (28-30). However, in the present study, no antimicrobial activity whatsoever was observed in the extract against the microorganisms studied.

Characterization of granules

After cleaning, drying, and grinding the seeds, the granulometry was determined, with granules of an average diameter of 650 µm obtained. By evaluating different commercial exfoliating products, it was observed that the sizes of the plastic microspheres employed varied from 60 µm to 800 µm in diameter (31). Thus, the particle size of the granules produced proved to be suitable for use in cosmetics.

In addition, the density of the granules in the helium pycnometer was determined in order to verify the buoyancy capacity of the cosmetic products. The results obtained were 1.3559 ± 0.0018 g cm^{-3} (n=5). This value indicated that the granules would not be able to remain suspended in liquid samples. Therefore, we chose to aggregate the granules in an exfoliating cream due to its higher viscosity.

There was also a concern in assessing the micromorphology of the particles obtained, because irregular edges can irritate the skin. causing micro-scratches, lesions, and inflammation (32). The scanning electron microscopy photomicrographies (Figure 1) revealed that the particles produced by the grinding process are irregular. Therefore, they were not suitable for incor-

Resultados e Discussão

Caracterização do extrato antocianínico seco

Os solventes mais utilizados para a extração de antocianinas a partir de frutos são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona. A extração com metanol é a mais eficiente, mas o etanol é preferido devido à sua muito menor toxicidade (9). O uso de soluções hidroalcoólicas varia entre 50% a 95% (v/v) em vários processos de extração (7,25,26). O rendimento do processo de extração foi de 2,3% (m/m) (2,25 g extrato seco/100 g fruto) e pode ser considerado eficiente. A concentração total de antocianinas no extrato foi de 1,09 ± 0,10 g / 100 g polpa, pelo que os frutos da palmeira Jussara provaram ser uma boa fonte deste pigmento. No entanto, a avaliação destes parâmetros deve também considerar o grau de maturação do fruto, a localização geográfica da planta, entre outros fatores (25,27).

A atividade antioxidante do extrato antocianínico obtido a partir do fruto da Jussara foi de 139,0 ± 5,5% em relação ao ácido ascórbico, indicando assim uma elevada capacidade antioxidante do extrato. Esta propriedade foi também observada em outros trabalhos encontrados na literatura (28-30). No entanto, neste trabalho de investigação não foi observada qualquer atividade antimicrobiana do extrato contra os microrganismos estudados.

Caracterização dos grânulos

Após limpeza, secagem e trituração das sementes, determinou-se a granulometria, tendo-se obtido grânulos com um diâmetro médio de 650 µm. Através da avaliação de diferentes produtos esfoliantes comercializados no mercado, observou-se que os tamanhos das microesferas de plástico utilizadas variavam entre 60 µm e 800 µm de diâmetro (31). Desta forma, o tamanho dos grânulos produzidos neste estudo mostrou-se adequado para o uso em cosméticos.

Adicionalmente, determinou-se a densidade dos grânulos em picnómetro de hélio, com o objetivo de verificar a capacidade de flutuabilidade em produtos cosméticos. Os resultados obtidos foram de 1,3559 ± 0,0018 g cm^{-3} (n=5). Este valor indicou que os grânulos não seriam capazes de se manterem em suspensão em amostras líquidas. Assim, optou-se por agregar os grânulos num creme esfoliante em função da sua maior viscosidade.

Existiu também a preocupação em avaliar a micromorfologia das partículas obtidas, pois rebordos irregulares podem irritar a pele causando micro-arranhões, lesões e inflamação (32). Por observação das imagens de microscopia eletrónica de varrimento (Figura 1), observou-se

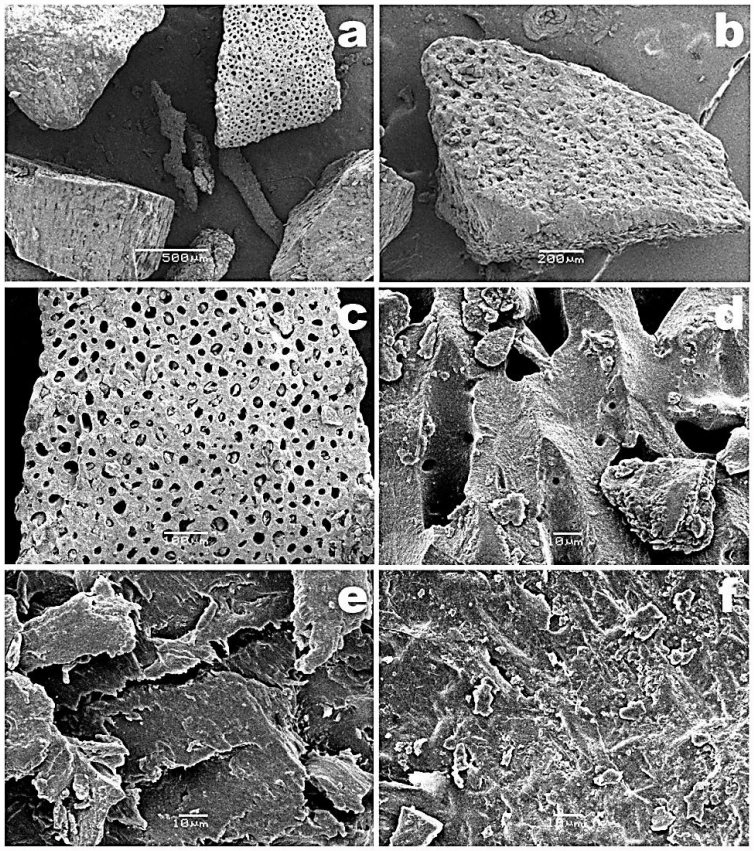


Figure 1 - Scanning Electron Microscopy Photomicrographs of Jussara fruit seed granules, obtained after the grinding process by knife milling, at various magnifications (a, x50; b, x75; c, x150; d, x1000; e, x1000; f, x1000)

Figura 1 -Fotomicrografias de microscopia eletrónica de varrimento de grânulos de semente de fruto de Jussara, obtidas após o processo de trituração por moinho de facas, para várias magnificações (a, x50; b, x75; c, x150; d, x1000; e, x1000; f, x1000)

poration into cosmetic preparations intended for facial exfoliation. Thus, we chose to incorporate the particles produced in a cream for body exfoliation.

Characterization of shading shampoos

When the shampoo containing 0.2% (w/v) of anthocyanin extract was used, there was almost no change in color in the hair strand. With the use of the shampoo containing 0.4% (w/v) anthocyanin extract, the blonde tone of hair was darkened more than expected. Thus, the concentration of 0.3% (w/v) anthocyanin extract was set as the most suitable for the production of the shading shampoo. Figure 2 shows the locks of hair tinted with the three prepared shampoos.

The anthocyanin extract exhibited good ability as a colorant. However, this ability has still been little explored for cosmetic uses. Studies point to the use of anthocyanins as a dye in lipsticks (33) and hair coloring sprays

que as partículas produzidas pelo processo de trituração são irregulares. Assim, não são indicadas para incorporação em preparações cosméticas intencionadas para esfoliação da face. Optou-se, portanto, pela incorporação das partículas produzidas num creme para esfoliação corporal.

Caracterização do shampoo matizante

Quando foi utilizado o shampoo contendo 0,2% (m/v) de extrato antocianínico quase não houve alteração de cor na mecha de cabelo. Já com a utilização do shampoo contendo 0,4% (m/v) de extrato antocianínico, o tom de loiro da mecha de cabelo escureceu mais do que o previsto. Assim, determinou-se como mais adequada para a produção do shampoo matizante a concentração de 0,3% (m/v) de extrato antocianínico de Jussara. A Figura 2 apresenta as mechas de cabelo matizadas com os shampoos.

O extrato de antocianinas demonstrou boa capacidade como colorante. Contudo, esta capacidade ainda tem

Figure 2 - Photographs of locks of hair after washing with shading shampoos with different concentrations of Jussara extract (a= 0.2%, b= 0.3% and c= 0.4% w/v)

Figura 2 - Fotografias de mechas de cabelo após a lavagem com os shampoos matizantes com diferentes concentrações de extrato de Jussara (a= 0,2%, b= 0,3% e c =0,4% m/v)

(34). However, it has been observed that the hair fiber has a high anthocyanin accumulation capacity and excellent washing stability (35).

The methods used to assess the quality of the shading shampoo involved sensorial and physicochemical analyses (36), evaluating organoleptic characteristics, pH value, height and stability of the foam formed, relative density and apparent viscosity. Table 3 displays the results obtained in these procedures.

Regarding the pH value, it is recommended that shampoos for daily use have a pH value ranging from 5 to 7. Hence, the shading shampoo produced, with a pH value between 5.5 and 6, was considered adequate as a product for capillary use. The relative density of the shading shampoo was 1.064 g cm^{-3}, an expected value and within the standards of a shampoo-type product. Apparent viscosity and density are important rheological properties for the acceptance of a cosmetic product, as they are related to the quality of the product. Although the foam formed is not directly linked to the cleaning process, it represents an important sensory factor for the consumer (33,37). Adequate foaming was observed in the formulated shampoo, which can be considered as a positive quality factor for the product.

sido pouco explorada no uso em cosméticos. Trabalhos de investigação apontam o uso de antocianinas como corantes em batons (33) e sprays para coloração de cabelos (34). No entanto, tem sido observado que a fibra capilar possui elevada capacidade de acumulação de antocianinas com excelente estabilidade à lavagem (35).

Os métodos utilizados para avaliação da qualidade do shampoo matizante envolveram análises sensoriais e físico-químicas (36), sendo avaliadas características organolépticas, pH, altura e estabilidade da espuma formada, densidade relativa e viscosidade aparente. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nestes ensaios.

Em relação ao valor do pH, é recomendado que os shampoos de utilização diária apresentem valores de pH entre 5 e 7. Assim, o shampoo matizante produzido, com valor de pH entre 5,5 e 6,0, foi considerado adequado como produto de uso capilar. A densidade relativa do shampoo matizante foi de 1,064 g cm^{-3}, um valor esperado e dentro dos padrões de um produto do tipo shampoo. A viscosidade aparente e a densidade são propriedades reológicas importantes para a aceitação de um produto cosmético, pois estão relacionadas com a qualidade do produto. Ainda que a espuma formada não esteja diretamente ligada ao processo de limpeza,

Table 3 - Results obtained for the quality parameters of shading shampoo produced with 0.3% (w/v) of anthocyanin extract obtained from the fruits of Jussara palm tree
Tabela 3 - Resultados obtidos para os parâmetros de qualidade do shampoo matizante produzido com 0,3% (m/v) de extrato antocianínico obtido a partir do fruto da palmeira Jussara

Parameter evaluated / Parâmetro avaliado	Results obtained / Resultados obtidos
pH	6.070 ± 0.085
Viscosity* / Viscosidade*	10.6439 ± 0.816 cSt
Relative density** / Densidade relativa**	1.064 ± 0.085 g cm^{-3}
Foam formation and stability / Formação e estabilidade da espuma	14 cm of height // 10 min. / 14 cm de altura // 10 min.
Colour / Cor	Reddish (Absorbance = 1.548 a 550 nm) / Avermelhada (Absorbância = 1,548 a 550 nm)
Fragrance / Odor	Characteristic / Característico

*Calculated using a Ford Cup viscometer from Gehaka (São Paulo, Brazil) and orifice nº 2; The viscosity produced was the average of the values obtained, expressed in mm^2/s or Centistokes (cSt) (40). **Calculated using a pycnometer.
*Calculada utilizando-se viscosímetro Copo Ford da marca Gehaka (São Paulo, Brasil) e orifício número 2; A viscosidade produzida foi a média dos valores obtidos, expressa em mm^2 /s ou Centistokes (cSt) (40). **Calculada utilizando-se um picnómetro.

Table 4 - Physico-chemical properties of shampoo samples in different storage times and temperature conditions
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das amostras de shampoo matizante em diferentes tempos de armazenamento e condições de temperatura

Temperature (Cº) / Temperatura (Cº)	Time (days) / Tempo(dias)	Organoleptic characteristics (color, odor, appearance) / Características organolépticas (cor, odor, aspecto)	pH	Viscosity* (cSt) / Viscosidade* (cSt)
25 ± 5ºC	0	No changes / Sem alterações	6.07	10.64
	30	No changes / Sem alterações	6.10	9.99
	60	No changes / Sem alterações	5.80	10.89
	90	No changes / Sem alterações	5.9	10.80
42 ± 2 ºC and 75% UR*	0	No changes / Sem alterações	6.07	10.64
	30	No changes / Sem alterações	5.80	10.70
	60	No changes / Sem alterações	5.90	11.20
	90	No changes / Sem alterações	5.90	10.11

*Calculated using a Ford Cup viscometer from Gehaka (São Paulo, Brazil) and orifice nº 2; The viscosity produced was the average of the values obtained, expressed in mm^2/s or Centistokes (cSt) (40). **UR = relative humidity
*Calculada utilizando-se viscosímetro Copo Ford da marca Gehaka (São Paulo, Brasil) e orifício número 2; A viscosidade produzida foi a média dos valores obtidos, expressa em mm^2 /s ou Centistokes (cSt) (40).; **UR = humidade relativa

Regarding the shampoo samples, no changes were observed during the period of the preliminary stability tests. In the accelerated stability studies, no significant organoleptic changes were observed with impairment of sensorial characteristics or in relation to pH and viscosity values, during the entire evaluated storage period (Table 4).

Characterization of the body exfoliating cream

The physical or mechanical exfoliation of the skin is superficial, since the active exfoliating agent does not interact with the internal layers of the skin. The exfoliating agent content based on polyethylene in cosmetic preparations may range from 0.05% to 12% (w/w), depending on the type of product and particle size (15). Thus, the addition of 1%, 1.5%, and 2% (w/w) exfoliating granules were tested because they are the most commonly present in cosmetic products with exfoliating functions. The addition of 1.0% (w/w) exfoliating granules was the most adequate from both visual and sensorial aspects, being chosen for the formulation of the body exfoliating cream.

The exfoliating body cream produced was characterized and subjected to the preliminary stability and accelerated stability tests. The quality evaluation of the body exfoliating cream included sensorial and physicochemical analyses (34), organoleptic characteristics, pH value, viscosity and scattering. The results obtained in these tests are displayed in Table 5.

Regarding the organoleptic characteristics of the body exfoliating cream, the formulation produced was macroscopically homogeneous, shiny, exhibiting white color and pleasant odor, with uniform distribution of the exfoliating granules. The viscosity, pH, and spreadability parameters were adequate for a body cream and are important parameters for the consumer acceptance of the product (39). The spreadability and viscosity of semisolid preparations are quite variable depending on their constituents, form of preparation, and intended use (22).

Accelerated stability tests (centrifugation, heat stress, and freeze-thaw cycles) indicated good physical-chemical stability without creaming, flocculation, or coalescence phenomena.

The exfoliating body cream prepared had a pH value suitable for body use, which remained stable throughout the storage period. After 90 days of storage, the pH values showed a small decrease, but still remaining within the pH range considered suitable for a cosmetic product to be applied on the skin. Throughout the storage period studied, no changes were observed indicating loss of stability of the developed body exfoliating cream. The

ela representa um fator sensorial importante para o consumidor (36,37). No shampoo matizante formulado observou-se uma adequada formação de espuma, o que pode ser considerado um fator de qualidade positivo para o produto.

Não foram observadas quaisquer alterações durante o período de realização dos ensaios de estabilidade preliminar nas amostras de shampoo. Nos estudos de estabilidade acelerada não se observaram alterações organolépticas significativas com comprometimento das características sensoriais, em relação aos valores de pH e de viscosidade, durante todo o período de armazenamento avaliado (Tabela 4).

Caracterização do creme corporal esfoliante

A esfoliação física ou mecânica da pele é superficial, uma vez que o agente esfoliante ativo não interage sob a pele. Teores de agentes esfoliantes à base de polietileno em preparações cosméticas podem variar entre 0,05% a 12% (m/m), dependendo do tipo de produto e tamanho das partículas (15). Assim, testou-se a adição de 1%, 1,5% e 2% (m/m) de grânulos esfoliantes, por serem estes os teores mais vulgarmente presentes em produtos cosméticos com função esfoliante. A adição de 1,0% (m/m) de grânulos esfoliantes foi considerada a mais adequada tanto do ponto de vista visual como sensorial, sendo escolhida para a formulação do creme corporal esfoliante.

O creme corporal esfoliante produzido foi caracterizado e sujeito aos testes de estabilidade preliminar e de estabilidade acelerada. Os métodos de avaliação da qualidade do creme corporal esfoliante abrangeram análises sensoriais e físico-químicas (38), tendo sido avaliadas características organolépticas, pH, viscosidade e espalhabilidade. Os resultados obtidos nestes testes podem ser encontrados na Tabela 5.

Em relação às características organolépticas do creme corporal esfoliante, a formulação apresentou-se macroscopicamente homogénea, brilhante, com coloração branca e odor agradável, com distribuição uniforme dos grânulos esfoliantes. Os parâmetros viscosidade, pH e espalhabilidade foram considerados adequados para um creme corporal, sendo parâmetros importantes para a aceitação do produto pelo consumidor (39). A espalhabilidade e viscosidade das preparações semisólidas são bastante variáveis dependendo dos seus constituintes, forma de preparação e uso intencionado (22).

Os testes de estabilidade acelerada (centrifugação, stress térmico e ciclos de congelação-descongelação) indicaram uma boa estabilidade físico-química com ausência dos fenômenos de cremeação, floculação e coalescência.

Table 5 - Results obtained for the quality parameters of the exfoliating body cream produced with 1.0% (w/w) of exfoliating granules obtained from the seeds of the fruits of the Jussara palm tree
Tabela 5 - Resultados obtidos para os parâmetros de qualidade do creme corporal esfoliante obtidos a partir das sementes dos frutos da palmeira Jussara.

Parameter evaluated / Parâmetro avaliado	**Results obtained / Resultados obtidos**
Organoleptic characteristics / Características organolépticas	White color, shiny and homogeneous / Coloração branca, brilhante e homogénea Characteristic odor / Odor característico Uniform distribution of the granules / Distribuição uniforme dos grânulos
pH	5.950 ± 0.012
Viscosity* / Viscosidade*	921 ± 31.28 cP
Spreadability / Espalhabilidade	36-42 mm^2

*Calculated using a Brookfield viscometer, model DV-I Prime, with spindle nº 2. Viscosity in this equipment was obtained in centipoise (cP) (40)
*Calculada utilizando-se um viscosímetro da marca Brookfield, modelo DV-I Prime, com spindle n° 2. A viscosidade, neste equipamento, foi obtida em centipoise (cP) (40)

Table 6 -Physico-chemical properties of exfoliating cream samples in different storage times and temperature conditions
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas das amostras de shampoo matizante em diferentes tempos de armazenamento e condições de temperatura

Time (days) / Tempo(dias)	**Organoleptic characteristics (color, odor, appearance)/ Características organolépticas (cor, odor, aspecto)**	**pH**	**Viscosity*** (cP) / **Viscosidade*** (cP)	**Spreadability (mm^2) / Espalhabilidade (mm^2)**
0	No changes / Sem alterações	5.95	921 cP*	42-34
30	No changes / Sem alterações	5.94	913 cP	42-35
60	No changes / Sem alterações	5.94	917 cP	41-36
90	No changes / Sem alterações	5.91	916 cP	42-35
0	No changes / Sem alterações	5.96	920 cP	42-36
30	No changes / Sem alterações	5.94	917 cP	42-36
60	No changes / Sem alterações	5.94	919 cP	42-35
90	No changes / Sem alterações	5.92	919 cP	42-35

*Calculated using a Brookfield viscometer, model DV-I Prime, with spindle nº 2. Viscosity in this equipment was obtained in centipoise (cP)(40). **UR = relative humidity
*Calculada utilizando-se um viscosímetro da marca Brookfield, modelo DV-I Prime, com spindle n° 2. A viscosidade, neste equipamento, foi obtida em centipoise (cP) (40).; **UR = humidade relativa

results of the viscosity and spreadability were very consistent throughout the storage period, indicating that the cream prepared remained stable. Regarding the results obtained in the spreadability tests, it was observed that the values produced did not change significantly during the product storage period (Table 6).

Conclusions

The anthocyanin extract obtained from the fruits of Jussara palm tree showed a high content of anthocyanins and a high antioxidant capacity. Hence, the fruits of Jussara proved to be viable sources for the commercial exploitation of anthocyanins, with promising use in cosmetic products such as those formulated in the present research work. The use of a natural scrub is also very interesting as synthetic exfoliators are proving to be potent environmental contaminants. The shading shampoo exhibited adequate characteristics for the intended use and was stable during the stability tests performed. The body exfoliating cream integrating the granules obtained from the seeds of Jussara fruits showed excellent cosmetic properties and good stability.

The results of the study presented herein provide options for the use and valorization of the fruits of the Jussara palm tree.

O creme corporal esfoliante apresentou um valor de pH adequado para utilização corporal, tendo-se mantido estável durante todo o período de armazenamento. Após 90 dias de armazenamento, o valor de pH apresentou um pequeno decréscimo, mantendo-se no entanto dentro da gama de pH considerado adequado para um produto cosmético a ser aplicado sobre a pele. Durante todo o período de armazenamento estudado, não foram observadas alterações que indicassem perda de estabilidade do creme corporal esfoliante. Os resultados das determinações de viscosidade e espalhabilidade apresentaram-se bastante consistentes ao longo de todo o período de armazenamento, indicando que o creme preparado permaneceu estável. Em relação aos resultados obtidos nos testes de espalhabilidade, observou-se que os valores produzidos não variaram significativamente durante o período de armazenamento estudado (Tabela 6).

Conclusões

O extrato antocianínico obtido a partir dos frutos da palmeira Jussara apresentou elevado teor de antocianinas e elevada capacidade antioxidante. Assim, os frutos da Jussara provaram ser uma fonte viável para a exploração comercial de antocianinas, com utilização promissora em produtos cosméticos tais como os elaborados neste trabalho de investigação. O uso de um esfoliante de origem natural é também muito interessante, uma vez que os esfoliantes de origem sintética são potentes contaminantes ambientais.

O shampoo matizante apresentou características adequadas para o uso pretendido e mostrou-se estável durante os ensaios de estabilidade realizados. O creme corporal esfoliante integrando os grânulos obtidos a partir das sementes dos frutos de Jussara apresentou excelentes propriedades cosméticas e boa estabilidade.

Os resultados do estudo aqui apresentado propicia opções para a utilização e valorização do fruto da palmeira Jussara.

Acknowledgements

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (Ref. No. 2016/16641-3) is gratefully acknowledged. Project funding by FAPESP (Ref. No. 2018/05522-9 (Project PsaPhageKill)) in the form of a BPE fellowship granted to Victor M. Balcão is also hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientific and Technological Development Brazil, in the form of Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (Refs. No. 306113/2014-7 and 308208/2017-0).

Conflicts of interest

The authors state that there are no financial or personal relationships that might be perceived as potential conflict of interests.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil), pelo financiamento concedido para a realização de projeto de investigação (Ref. No. 2016/16641-3). O financiamento pela FAPESP (Ref. No. 2018/05522-9 (Projeto PsaPhageKill)) na forma de uma bolsa de investigação BPE concedida a Victor M. Balcão é também por este meio reconhecido. Este trabalho também recebeu suporte por parte do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil, na forma de Bolsas de Produtividade em investigação (PQ) concedidas a Victor M. Balcão (Refs. No. 306113/2014-7 and 308208/2017-0).

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem relações financeiras ou pessoais que possam ser vistas como potenciais conflitos de interesse.

References / Referências

1. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira MB, Lobo JMS. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. Cosmetics 2015; 2(2):48-65.
2. Joshi LS, Pawa HA Herbal cosmetics and cosmeceuticals: an overview. Nat Prod Chem Res 2015; 3(2): 2-8.
3. Garbossa WAC, Campos PMBGM. Euterpe oleracea, Matricaria chamomilla, and Camellia sinensis as promising ingredients for the development of skin care formulations. Ind Crops Prod. 2016; 83: 1-10.
4. Daher C.C, Fontes I.S., Rodrigues, R.O., Damasceno, G.A.B., Soares, D.S., Aragão, C.F.S., Gomes, A.P.B. and Ferrari, M. Development of O/W creams containing Euterpe oleracea extract and evaluation of photoprotective efficacy. Braz J Pharm Sci 2014; 50(3): 639-52.
5. Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Alvarez-Suarez JM, González-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzett, B. and Giampieri, F. A pilot study of the photoprotective effects of straberry-based cosmetic formulations on human dermal fibroblasts. Int J Mol Sci 2015; 16(8):17870-84.
6. Brito ES, Araújo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara and guajuru. J Agri Food Chem 2007; 55(23):9389-94.
7. Vieira GS, Cavalcanti RN, Meireles MAA, Hubinger MD. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (Euterpe edulis). J Food Eng 2013; 119(2);196-204.
8. Cortez R., Luna-Vital DA, Margulis D, Mejia EG Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. Compr Rev Food Sci Food Safety 2017; 16(1): 180-98.
9. Miraje SY, Amlepatil NM, Sahoo AK, Mote GV. Anthocyanin extraction from winery waste material: a review. J Innov Pharm Biol Sci 2015; 2(2); 218-21.
10. Silva HR, Assis DC, Prada AL, Keita H, Amado JRR, Carvalho JCT. Euterpe oleracea Mart. (açai): an old known plant with a new perspective. Afr J Pharm Pharmacol 2016;10(46):995-1006.
11. Suganya K, Preethi PS, Suganya M, Nanthini AUR. Natural pigments in cosmetics - past to present. Int J Pharm Sci Bus Manage 2016; 4(6):7-14.
12. França SA, Dario MF, Esteves VB, Baby AR, Velasco MVR Types of hair dye and their mechanisms of action. Cosmetics 2015; 2(2):110-26.
13. Dias MFRG Hair cosmetics: an overview. Int J Trichology 2015; 7(1): 2-15.
14. Wright SL, Thompson RC, Galloway TS The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. Environ Pollut 2013; 178:483-92.
15. Gouin T, Avalo J, Brunning I, Brzuska K, Graaf J, Kaumanns J, Koning T, Meyberg M, Rettinger K, Schlatter H, Thomas J, Van Welie R, Wolf T Use of micro-plastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North Sea environment. Int J Appl Sci. 2015; 3:40-6.
16. Bennett O, Hirst D. Microbeads and microplastics in cosmetic and personal care products. House of Commons Library 2017; 7510 (4): 1-17. Available from: https://researchbriefings.parliament.uk/ResearchBriefing/Summary/CBP-7510.
17. Rochman CM, Kross SM, Armstrong JB, Bogan MT, Darling ES, Green SJ, Smyth AR, Verissimo D. Scientific evidence supports a ban on microbeads. Environ Sci Technol. 2015; 49(18):10759−61.
18. Favaro, L. I. L.; Balcão, V. M.; Rocha, L. K. H.; Silva, E. C.; Oliveira Jr., J. M.; Vila, M. M. D. C.; Tubino, M. (2018) Physicochemical Characterization of a Crude Anthocyanin Extract from the Fruits of Jussara (Euterpe edulis Martius): Potential for Food and Pharmaceutical Applications, J. Braz. Chem. Soc. 29 (10): 2072-2088.
19. AOAC. Official methods of analysis of AOAC international 18th Edition, AOAC International, Maryland, 2005.
20. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 1999; 269(2):337-41.
21. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility Tests: Approved Standard. 18 ed. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA CLSI, 2003.
22. Ansel HC, Popovich NG, Allen JL. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery system. 8 ed., Ed Lippincott Willians & Wilkins, Philadelphia, 2005.
23. Brazil, National Agency of Sanitary Surveillance. Resolution of the Collegiate Board of Directors RDC nº 67, of October 8, 2007. Provides on good practices of manipulation of the magistrate and official preparations for human use in pharmacies. DOU, nº 195, 2007 October 9. Section 1. pp. 29-58, 2007.
24. SILVA LC, Vieira JPC, Silva LAC, Monteiro OS, Carmo LHA, Delineamento de formulações cosméticas com óleo essencial de Lippia gracilis Schum (Alecrim-de Tabuleiro) de origem amazônica. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2015; 36(2): 319-326.
25. Proença KS, Roma RM, Oliveira RVM, Gonçalves MM, Vila MMDC. Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência. Rev Bras Farm 2006; 87(3):74-7.
26. Lima AJB, Corrêa AD, Saczk AA, Martins MP, Castilho RO. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jabuticaba. Rev Bras Frut. 2011; 33(3):877-87.
27. Patil N, Datar A. Extraction, stability and separation of anthocyanins of Ixora coccinea Linn. Int J Pharm Pharm Sci 2015; 7(3):198-202.
28. Schulz M, Borges GSC, Gonzaga LV, Seraglio SK., Olivo IS, Azevedo MS, Nehring P, Gois JS, Almeida TS, Vitali L, Spudeit DA, Micke GA, Borges DLG, Fett R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (Euterpe edulis Martius) during ripening. Food Res Int 2015; 77: 125-31.
29. Schulz M, Borges GSC, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Juçara fruit (Euterpe edulis Mart): sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. Food Res Int 2016; 89:14-26.
30. Borges GS, Vieira FGK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiazi R C, Mancini Filho J, Fett R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (Euterpe edulis) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. Food Res Int 2011; 44(7): 2128-33.
31. Chang M. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. Mar Pollut Bull 2015; 101(1): 330-33.
32. Abu-Dief EE. Morphological changes of the skin following microdermabrasion and chemical peeling. Ann Histol Surg Pathol 2017; 1(1): 3-4.
33. Sandriani Y, Nugroho B H, Tsani SFI, Syukri Y. (2017). Formulation of lipbutter using Red Dragon fruit extract (Hylocereus costaricensis) as natural dyes with various oil phase concentration. Int J Res Sci 2017; 3(3): 6-8
34. Pipattanamomgkol P, Lourith N, Kanlayavattanakul M. (2018). The natural approach to hair dyeing product with Cleistocalyx nervosum var. paniala. Sustain Chem Pharm 2018; 8: 88-93.
35. Rose P M, Cantrill V, Benohoud M, Tidder A, Rayner CM, Blackburn RS. Application of anthocyanins from blackcurrant (Ribes nigrum l.) fruit waste as renewable hair dyes. J. Agric. Food Chem. 2018: 66, 6790−6798.
36. Kumar A, Mali RR. Evaluation of prepared shampoo formulations and to compare formulated shampoo with marketed shampoos. Int J Pharm Sci Rev Res 2010; 3(1): 120-6.
37. Molvovan M, Parauan S. Cosmetic evaluation of some commercial shampoos. Clujul Med 2012; 85(3): 378-83.
38. Brazil, National Agency of Sanitary Surveillance. Guide to quality control of cosmetic products: an approach to physical and chemical testing. 2 ed, Anvisa, Brasília, 2008.
39. Montenegro L, Rapisarda L, Ministeri C, Puglisi G. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic creams containing vitamin E. Cosmetics2015; 2(1): 35-47.
40. Farmacopeia Brasileira. 5a ed, Anvisa, Brasilia, 2010.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Supplement | *Suplemento* *Biomed Biopharm Res.*, 2020; 17(1): 119-133

doi: 10.19277/bbr.17.1.229

III Jornadas Lusófonas da Nutrição

III Lusófona's Nutrition Meeting

3-4 March, 2020

Auditório Agostinho da Silva (ULHT)

Lisbon, Portugal

Welcome Message

On behalf of the Organization Committee for the **III Jornadas Lusófonas da Nutrição**, we are pleased to invite you to the this event, that will be held in Lisbon (Portugal), on **March 3-4** (Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; Auditório Agostinho da Silva).

The **III Jornadas Lusófonas da Nutrição** is an academic event that aims to analyze several emerging themes in the area of nutrition sciences, highlighting the importance of nutritionists in their most distinct areas of activity, with special attention on the role of nutritionists in the social network.

This event has the participation of several specialists in clinical nutrition, public health, and other specialties, so the presence of nutritionists, researchers, doctors, nurses, pharmacists, food engineers, and other health professionals and the agri-food industry is of particular interest.

Organization Committee

Cíntia Pêgo

Emília Alves

João Gregório

Nelson Tavares

Núcleo de estudantes da licenciatura em ciências da nutrição

Scientific Committee

Bruno Sousa

Filipe Teixeira

Patrícia Rijo

Institutional sponsorship

Sponsors

Scientific detailed program

March 3rd

09:00h: Opening ceremony
Prof. Dr. Luis Monteiro Rodrigues, Director of the Health Sciences School
Prof. Dr. Nelson Tavares, Director of the Nutrition and Dietetics degree
Prof. Dr. Lino Mendes, Ordem dos Nutricionistas

09:30h: Clinical Nutrition I
Last evidence in oncology applied nutrition - Profª. Drª. Paula Ravasco, Hospital Universitário de Santa Maria; Universidade de Lisboa; CIIS Universidade Católica Portuguesa
The role of Dietitians on cancer - Drª. Inês Carretero, Mama Help
Oral communications:
Food intake and IGF-1 modulation in Breast Cancer: A case study – **Laurinda Simões**
In vitro anticancer activity of phenolic bioactive compounds studied in a human renal cancer cell model – **Rita Caparica**
The dietary compound erucin impacts renal cancer cells viability and motility - **Íris Guerreiro**
Ketogenic diet vs VLCKD: myths and facts – **Joana Lima** (Sponsored by Kalibra-Prk group)

11:00h: Coffee break

11:30h: Nutrition tomorrow
Projeto Mun-si/CEIDSS - Drª Joana Baleia, Mun-si/CEIDSS
Oral communications:
Characterization of Chromium Binding in Lalmin Mineral Enriched Yeast - **Lauri Valk** (Sponsored by *Lallemand*)
Impact Of University Environment On Food Choices Of Displaced Students – **Rita Bárbara**
Influence of Instagram and Digital Influencers on College Student Feeding – **Tatiana Fontes**

13:00h: Lunch

14:00h: Nutrition today
Nutritional education through social network - Drª. Mafalda Almeida, Loveat
Professional promotion through social networks - Drª Bárbara Oliveira, barbaranutricao.pt
Online nutritional appointments - Drª. Lilian Barros, Santa Melancia

15:30h: Coffee break

16:00h: Clinical Nutrition II
Sports supplementation - Prof. Dr. Vítor Hugo Teixeira, FCNAUP
Weight loss supplementation - Drª. Filipa Cortez Faria, Farmodiética
Disease supplementation - Drª Raquel Rodrigues, Nestlé Health Science

17:30h: Awards delivery and closing ceremony

March 4th

09:00h – 12:00h: "Energy regulation and strategies for weight control in the athlete" (ADVANCED WORKSHOP)
Prof. Dr. Ricardo Silvestre, Centro de Alto Rendimento do Jamor
Dr. Bruno Pereira, Centro de Alto Rendimento do Jamor

Oral communication abstracts

OC 1: Food intake and IGF-1 modulation in Breast Cancer: A case study

Laurinda Simões[1], Nelson Tavares[1,2]

[1] Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal
[2] CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal
E-mail: laurindamariasimoes@gmail.com

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide and is therefore a field of research that has gained particular relevance. Research involving food intake and IGF-1 modulation in breast cancer is scarce. Here we present a case study of a woman with HER2-positive breast cancer that after chemotherapy and radio therapy used Whole Food Plant Based Dietary pattern for 232 days. Blood markers including IGF-1, Glycemia, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Total Cholesterol, Haemoglobin, and also Body Mass Index were assessed at baseline and after 210 days. The woman baseline IGF-1 was 21 nmol/L and decreased to 16.3 nmol/L after 210 days. Glycemia was 80 mg/dL and increased to 85 mg/dL, LDL-Cholesterol was 82 mg/dL and decreased to 81 mg/dL, LDL-Cholesterol was 73 mg/dL and increased to 80 mg/dL, Total Cholesterol was 155 mg/dL and increased to 161 mg/dL, Haemoglobin was 12.8 g/dL and increased to 13 g/dL and BMI was 21.7 kg/m^2 decreased to 20.6 kg/m^2 after 210 days. A decrease of 22.4 percent in IGF-1 and an increase of 6.3 percent in Glycemia were noted. Additional research is necessary to confirm these promising results on IGF-1 and to clearly whether Whole Food Plant Based Diet dietary pattern might be clinically useful.

OC 2: In vitro anticancer activity of phenolic bioactive compounds studied in a human renal cancer cell model

Rita Caparica[1,2], Ana Júlio[1,2], André Rolim Baby[3], Tânia Santos de Almeida1,[4,#] and João Guilherme Costa[1,#]

[1] CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal
[2] Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain
[3] Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 15, São Paulo, SP 05508-900, Brazil
[4] CQB, CQE and Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Campo Grande 1749-016 Lisbon, Portugal.
 # Shared senior authorship
Email: rita.caparica@ulusofona.pt, jgcosta@ulusofona.pt, tania.almeida@ulusofona.pt

Several studies have highlighted the therapeutic properties of different bioactive compounds from natural sources. Among them, phenolic compounds emerge with a very interesting pharmacological potential to prevent and treat some human diseases, including cancer. Rutin and the phenolic acids, ferulic, caffeic and p-coumaric acids, are widely found in nature and are commonly present in the human diet, namely in plants (eg. buckwheat, bamboo shoots) and fruits (eg. oranges, apples). Interestingly, the impact of these bioactive compounds on renal cancer is not completely established.
Thus, the aim of this study was to evaluate the impact of the four studied phenolic compounds in the viability of 786-O human renal cancer cells, using the MTT and the CV assays. The MTT results revealed that, while ferulic,

caffeic and p-coumaric acids did not significantly influence the cell viability, rutin decreased the cell viability of the human renal cancer cells in a concentration-dependent manner. Additionally, the CV assay also showed that the ferulic, caffeic and p-coumaric acids (up to 250 µM) did not influence the viability of the 786-O cells. At higher concentrations (500 and 1000 µM), although ferulic acid did not significantly affect the cell viability of 786-O cells, caffeic and p-coumaric acids decreased the cell viability of human renal cancer cells.
In conclusion, our results showed that rutin was the most promising compound, as observed by the cytotoxic effect against 786-O renal cancer cells. This demonstrates the potential anticancer effect of this natural compound, that deserves to be further explored.

Acknowledgments: The authors would like to thank to Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (UID/DTP/04567/2019). Rita Caparica and Ana Júlio would like to acknowledge ALIES for the grant PADDIC 2018-2019.

OC 4: Ketogenic diet vs VLCKD: myths and facts

Joana Lima[1]

[1]*Pronokal group, Kalibra diet*
E-mail: joana.l@pronokal.com

According to the WHO, worldwide obesity has almost tripled since 1975. In 2016, there were more than 1,900 million adults over the age of 18, overweight or obese in the world.
Many strategies have been proposed to combat the advancement of obesity in the world, from diets low fat and relatively high levels of carbohydrates, through drug-based therapies to bariatric surgery. Thus, the emergence of other effective and safe nutritional approaches for the effective fight against obesity is important.
Myths like the ketogenic diet is dangerous; rapid weight loss is associated with poorer long-term weight outcomes; there is irritability, bad mood and frequent headache in the ketosis state; our brain does not function well without carbohydrates or that we are subject to nutritional deficiencies after performing a ketogenic diet have already been clarified by science.
Much has been said about the ketogenic diet for weight loss in recent times, there are those who support it and those who are against it. So, is this a valid nutritional strategy? What harms and benefits will it bring with itself?, but what is a Ketogenic Diet?
Its definition is based on a diet with low carbohydrate content (50g / day or 10% of the TEV), high fat content (> 60% of the TEV) and normalized intake of protein, with or without energy limit. Therefore, it is necessary to introduce another concept of ketogenic diet: very low caloric Ketogenic diet (VLCKD), in which TEV is between 450 to 800Kcal / day, with a reduction in the intake of carbohydrates and fats and an adequate intake of protein. Both induce a metabolic condition called "physiological ketosis", thus distinguishing it from ketoacidosis, but the two approaches differ greatly from the fat content of the diet.
The possibility of a high intake of saturated fat and an endless number of calories per day makes the ketogenic diet doubtful in terms of safety and efficacy when compared to VLCKD.
The Kalibra Method is a VLCKD that guarantees an effective, safe and quality weight loss, reduces body fat and preserves lean mass as much as possible. It is a method divided into different stages: weight loss, transition and maintenance and always applied under the supervision of a nutrition professional. It appears as a nutritional.

OC 5: Characterization of Chromium Binding in Lalmin Mineral Enriched Yeast

Lauri Valk, Jacinthe Côté[1], Myriam Tourancheau[2], and Nadine Renard[3]

[1] Lallemand Baking, Montreal, QC, Canada;
[2] Lallemand Bio-Ingredients, QC, Canada
[3] Lallemand Health Solutions, Zurich, Switzerland

Chromium deficiency in humans results in symptoms comparable to those associated with diabetes. A systematic review and meta-analysis suggests favorable effects of chromium supplementation on glycaemic control in patients with diabetes. Chromium supplementation may also improve triglycerides and HDL-C levels. More specifically, the effect of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress has been described in animal and human subjects.
Yeast Saccharomyces cerevisiae can be fermented with the addition of salts containing chromic chloride (Cr 3+ ions) resulting in its incorporation into yeast cells components. When evaluating the efficacy of this process, one needs to determine the overall percentage of chromium bound to yeast in the finished product. Since salts, minerals, as well as various inorganic, organic and biological molecules can form crystals— X-ray crystallography was used to evaluate the types of chemical bonds formed between yeast and chromium. X-ray crystallography is a tool used for identifying the atomic and molecular structure of a crystal, in which the crystalline atoms cause a beam of incident X-rays to diffract into many specific directions. X-ray analyses by crystallography were performed on Lalmin Cr2000, a chromium mineral enriched yeast, to determine the presence of residual chromium salts (chromium chloride, CrCl 3).Generally when crystalline substances are present at 2% or more of the molecular mass, they will be detected by X-ray analyses. The results of the X-ray analysis of Lalmin Cr 2000 showed no diffraction peaks above the amorphous contribution from normal, unenriched yeast. These results suggest that, in the produced chromium enriched yeast 100% of the chromium was incorporated into the yeast molecular structures.
In order to further characterize the chromium in Lalmin Cr2000 yeast, it's location in the yeast cell and how it is organically bound, an enzymatic fractionation technique was applied. By selectively liberating the mineral from the different yeast cell components, it was possible to characterize the mineral distribution in the yeast cell. Hydrolyses using amylase, protase, pronase, beta-glucanase and deoxyribonuclease were performed on Lalmin Cr2000 yeast. The different yeast cell fractions, isolated by centrifugation, were recovered and subjected to ICP-MS to determine their chromium concentrations. The results showed that the majority of the chromium incorporated into Lalmin Cr2000 was associated with the yeast intracellular proteins (55%), the cells wall components (24%) and the yeast DNA (10%). These results also confirmed that the majority of the chromium incorporated into Lalmin Cr2000 was organically bound.

OC 6: Impact Of University Environment On Food Choices Of Displaced Students

Rita Bárbara[1], Cíntia Ferreira-Pêgo[2]

[1] School of Science and Humanity, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
[2] CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal
E-mail: ritaantunes14@gmail.com

Currently, there is a change in eating patterns, especially in the younger generations, who are leaving the traditional Mediterranean diet, which is associated with numerous benefits such as better quality of life and longevity, and adopting a typical Western diet, poor in fruit and vegetables and high in fast food and sugary drinks. University students are a vulnerable group as they are exposed to various influences, and displaced students seem to be more predisposed to develop unfavourable eating habits. The aim of this study was to assess the adherence to the Mediterranean diet of Portuguese university students from the Lisbon region and to find out whether, upon entering

the university, students changed the frequency of eating certain foods and meals, comparing displaced and non-displaced students. For this purpose, self-administered questionnaires were applied thru an online platform to 102 students, with an average age of 21 years. The study population has an average body mass index (BMI) classified as normal and an average adherence to the Mediterranean diet. Most students are non-smokers and about half of the population drinks coffee, of which the displaced are the largest consumers. Finally, it was found that displaced students changed their frequency of consumption of fish and fast food after entering university, showing less frequency of fish consumption and equal or higher frequency of consumption of fast food.

OC 7: Influence of Instagram and Digital Influencers on College Student Feeding

Tatiana Fontes[1], Cíntia Ferreira-Pêgo[2]

[1] School of Science and Humanity, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
[2] CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal
E-mail: tatiana.fontes.97@gmail.com

Internet use is increasing year by year, as have investigations of this addiction in young people. Instagram has become one of the most used social networks by young people around the world. A closer look at this social network showed that the hashtag "Food" is one of the 25 most used. For this reason, the present study aims to verify the influence that Instagram and digital influencers have on the feeding of college students. Was analyzed the information of 150 participants, aged between 18 and 35 years old, residing in Portugal, by participating in the study "Influence of Instagram and Digital Influencers on College Student Feeding", a quantitative cross-sectional survey. Data were obtained by completing an online questionnaire,in the Google search engine, where variables regarding general population characteristics (age, gender, course, place of residence, etc.) and variables related to Instagram (frequency of use, dislocation to establishments, aspects that raise most interest, among others) and digital influencers (credibility, notoriety of establishments, adherence to food tips / advice and adherence to diets / dietary regimes, obtaining the desired results, among others) were evaluated. After the analysis, with the aid of the SPSS software, it was found that 43.3% of the participants said they had already followed food tips / advice. Of which 52.3% stated that they did not verify the scientific credibility of these same tips, with a statistically significant difference (P value = 0.001) in both questions, when comparing courses in health and sports with courses in other áreas. On the other hand, 40% of the population says they have already adhered to diets advertised by digital influencers, not having statistically significant differences between courses. Being that, 65,3% of the sample, affirms not having obtained the desired results. In conclusion, Instagram and digital influencers may have a direct inflence on the dietary choices of college students, especially in non-health and sports related areas.

Poster abstracts

P1: Body shape concerns in Portuguese university students

Cíntia Ferreira-Pêgo[2], Adriana Costa[1], Joana Rodrigues[1], Bruno Sousa[1,2]

[1] School of Science and Humanity, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
[2] CBIOS-Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal
E-mail: adriana.t.costa@hotmail.com

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.

P2: Development of a novel and sustainable food product: lupine-based vegetable "cheese"

Catarina Lucas[1], Inês Bordalo[1], Inês Ferreira[1], Laurinda Simões[1], Tatiana Ferreira[1], M. Cristiana Nunes[1,2]

[1] ECTS – Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal
[2] LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal
E-mail:catarinalucasosl@hotmail.com

Global food production comprises climate stability and the resilience of the entire ecosystem, being the largest contributor to environmental degradation and transgression of the planet's boundaries [1].
Animal-based proteins, such as dairy products, eggs, fish and meat, are the foundation of Western diets and an integral part of global food production [2]. However, dairy products and meat (mainly red) are also amongst the types of food that require large amounts of water for their production, emitting more greenhouse gases [1,2]. Substantial changes and improvements in food production practices are required, like drastically reduce food waste and develop plant-based nutrition standards [1,3]. Sustainable food sources that could potentially feed the world's growing population include plant-based proteins [1,2].
Lupin is a legume that has been grown over thousands of years, all over the world and in a variety of soil conditions. It can fix nitrogen and absorb phosphates directly from the soil and it does not require nitrogen fertilizers, which makes it a sustainable crop. In addition, lupin has one of the highest levels of protein amongst legumes and is considered to have an excellent amino acid profile, whilst also containing a high fibre content [4]. Such characteristics allow its usage in a variety of food applications, including the replacement of milk proteins in gelled mixed systems [5].
The present study aims to develop a healthy and sustainable vegetable "cheese" with lupin, adapted to the general

population. A formulation based on almond drink and cashew, using agar as gelling agent, was used to test two formulations with lupin beans and compare with the control. The nutritional value of the vegetable "cheeses" was determined using Cronometer© software. Sensory analysis assays using an untrained panel of 25 people, with ages between 18 and 52, were carried out. The parameters evaluated were colour, texture, taste, aroma, overall impression and buying intention, using a 5-level scale.
Vegetable "cheeses" with lupin have lower energy and saturated fat contents compared to control, and were considered by the tasters as the most appealing in taste, flavour, texture and colour. This study suggests that lupin enhance the nutritional and sensory properties of vegetable gelled systems and could become widely consumed in the next future.

References:
[1] EAT-Lancet Commission. EAT-Lancet Commission on Healthy Diets from Sustainable Food Systems - Summary Report, 2019.
[2] Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L. Proteins in the diet: challenges in feeding the global population. In: Sustainable Protein Sources, Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2016.
[3] Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Alimentar o futuro: uma reflexão sobre sustentabilidade alimentar. E-book nº 43. Porto: Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2017.
[4] van de Noort, M. Lupin: An Important Protein and Nutrient Source. In: Sustainable Protein Sources, Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2016.
[5] Nunes, M.C., Batista, P., Raymundo, A., Alves, M.M., Sousa, I. (2003). Vegetable proteins and milk puddings. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 31 (1-4): 21-29.

P3: Dietary habits and adherence to the Mediterranean Diet of rotational shift work nurses

Fátima Ariés[1], Cíntia Ferreira-Pêgo[2]

[1]School of Sciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
[2]CBIOS Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal. e-mail: p5730@ulusofona.pt
E-mail: fatimaries@gmail.com

The aim of this study was to evaluate dietary habits and Mediterranean Diet (MD) adherence in relation to work-related factors of a group of 30 rotational shift work nurses, aged between 22 and 51 years, randomly recruited from a private hospital in Lisbon. A questionnaire was created to collect information on major shift work domains, general eating habits along with questions based on a validated 14-item questionnaire to assess MD adherence. The 53,6% of the participants revealed moderate adherence to MD and no significant differences were found in MD adherence score according to work-related variables. Participants working more hours per week and having less days off per week showed better dietary behavior, and less experienced nurses reported some lower quality snacks consumption. Nutritional intervention strategies for this population are required to improve dietary habits and prevent adverse health outcomes associated with shift work.

P4: Nutrition knowledge, Mediterranean diet, and age associated with eating behavior: a cross-sectional study of Portuguese university students.

Cíntia Ferreira-Pêgo[1,2], Joana Rodrigues[2], Adriana Costa[2], 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
E-mail: joanabeatrizr@gmail.com

Student life during the university period is characterized by many changes in eating behaviors and dietary pattern, due to the adaptation of a new environment, study stress, lack of proper time management and busy class schedules. These unhealthy actions may be detrimental to cognitive processing and influence academic performance, which is related to professional success.
Cross-sectional information about eating behavior was assessed using the Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ), in 169 students aged between 18 and 50 years, from the Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, from different academic courses, related or not with health sciences. Mediterranean diet adherence was also assessed using a validated 14-item questionnaire.
Of the 169 participants, 33 presented a restrained eating behavior, 73 an external and 63 an emotional. 62.10% of the nutrition sciences students presented an emotional eating behavior. In the nutrition sciences academic course, it was observed that these students presented a significantly higher risk of having an emotional eating behavior. Otherwise, presenting restrained eating behavior was statistically associated with being old and having a higher MedDiet adherence.
Studying nutrition sciences was associated with having an emotional eating behavior. Older students and those who adhere more closely to the MedDiet were associated with having a restrained eating behavior.

P5: The nutritional potentiality of grape pomace in human food: effect on texture and colour of salted cookies

Sousa, M.J.[1], Nunes, M.C.[1,2], Pereira, P.[3,4], Palma, L.,[4] Nicolai, M.[4*]

[1] ECTS – Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa - Portugal
[2] LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal
[3] CBIOS – Center for Research in Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal
[4] CERENA – Center for Natural Resources and Environment,, Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal
E-mail: marisa.nicolai@ulusofona.pt

The winemaking industry has become a valued segment worldwide in the sectors of agriculture, economy and environment. World wine production reached 292.3 million hectolitres in 2018, generating about 13 million tons of residue (1). These by-products, namely grape pomace, results from the pressing of the grape and consists of the solid parts such as stalks, stems, skins and seeds (2).
In recent years there have been numerous studies on the chemical, nutritional and physiological properties of this by-product, showing its diverse potential as a possible ingredient for human consumption, since many bioactive compounds reported high nutritional value and health benefits (3-6). Grape pomace is an excellent raw material for the development of other food products, in line with the concept of a circular economy.
In this study, we focus on two different grape pomaces (Arinto and Touriga Nacional, white and red wine varieties, respectively) from Alentejo, a Portuguese region. These residues were recycled through a drying and grinding

process giving rise to a flour. The objective of this work is to evaluate these grape pomace flours as innovative ingredients to enhance the functional properties of cookies. Three levels (5, 10 and 15 % w/w) were incorporated into a salt cracker formulation and compared to control. The cookie's physical properties were analysed for 4 weeks in terms of firmness, in a texturometer, and CIELAB colour parameters, using a colorimeter. The incorporation of grape pomace flours, even at 15 %, did not comprise texture. Innovative and stable tonalities varied, depending on the variety used, from violet (Touriga Nacional) to brown (Arinto). The developed cookies presented stable texture and colour along four weeks storage.
Considering the obtained results, grape pomace may potentially be considered innovative ingredient with functional properties and a value-added recycled and sustainable product.

References:
1. IV-Organização Internacional da Vinha e do Vinho. Retrieved December 8, 2019 from https://www.ivv.gov.pt/np4/35/.
2. Nicolai, M., Pereira, P., Rijo, P., Amaral, O., Amaral, A., & Palma, L. (2018). Vitis vinifera L. pomace: chemical and nutritional characterization. Nut. Food Sciences, Biomed Biopharm Res., (2018). 15 2, 156-166.
3. Gengaihi S.E.l., Ella F.M.A., Emad M.H., Shalaby E., & Doha H. (2014). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. J Food Process Technol 5: 296.
4. Garcia-Lomillo, J., García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16, 3–22.
5. Jianmei, Y., & Mohamed, A., (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. International Journal of Food Science and Technology 2013, 48, 221–237.
6. San'Atnna, V., Christiano, F.D.P., Matczak, L.D.F., Tessaro, I.C., & Thys, R.C.S. (2014). The effect of the incorporation of grape marc powder in fettuccini pasta properties. LWT – Food Science and Technology, 58, 497–501.

P6: Influence of stress caused by exams on eating habits of college students

Mónica Monteiro[1], Cíntia Ferreira-Pêgo[2]

[1]School of Sciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
[2]CBIOS Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal. e-mail: p5730@ulusofona.pt
E-mail: moniimonteiro12@gmail.com

University entrance is characterized as a period willing to stress, mainly caused by academic requirements. This leads to changes in eating behavior, namely a high desire to eat, a consumption of more palatable foods and a reduced intake of fruit and vegetables. Health students have more knowledge about healthy eating compared to other areas, but there is not always a relationship between their behaviors and this knowledge. A cross-sectional analysis was carried out with the objective of verifying whether the stress caused by the evaluations influences the students diet, as well as it differs between students of health courses and those from other areas. The study was composed by 346 portuguese university students from different courses. To assess their eating habits, the participants answered a questionnaire. 87% of university students had a regular consumption of foods rich in fat, sugar and salt as consolation. The vast majority (74%) used to eat to relieve stress. Students did not consumed more than 2 doses of vegetables and 3 pieces of fruit daily. The adoption of less healthy eating behaviors was mainly observed in students from areas other than health.

P7: Diterpenoids from edible Plectranthus spp. as potential chemopreventive and therapeutic agents in cancer

Vera M.S. Isca[a,b], Epole Ntungwe[a,c], Eva María Domínguez-Martína[c], Joana Tavares[a], Lucília Saraiva[d], Milica Pesic[e], Carlos A.M. Afonso[b], Patrícia Rijo[a],[b]

[a]CBIOS – Center for Research in Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal;
[b]Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;
[c]Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Spain; dLAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;
[e]Institute for Biological Research "Siniša Stanković"- National Institute of Republic of Serbia University of Belgrade, Serbia
E-mail: patricia.rijo@ulusofona.pt

Plectranthus is an Old-World genus belonging to Lamiaceae family, commonly known as mint family. This family include many aromatic plants, widely use in culinary, such as mint (Mentha piperita L.), sage (Salvia officinalis L.) or rosemary (Salvia rosmarinus). Plectranthus genus comprises more than 300 species distributed through the tropical and warm regions of the globe.1 Plectranthus species exhibit a wide range of uses in different areas as horticultury, floricultury, ethnobotany, household and as foodplants. Some of the species are traditionally used in culinary as aromatic herbs, starch or vegetables. Different parts of the plant are used such as the tubers (P. punctatus, P. edulis, P. rotundifolius, P. parviflorus), the fruits of P. parvifolius (which are employed as vegetables), the leaves (P. mollis, P. barbatus, P. amboinicus) and the stems of P. crassus and P. esculentus (the latter case as gruel sweetener).2 A large number of Plectranthus species are used in traditional medicine and have potential for development towards their use in the primary health care system.3 In fact, this genus is rich in valuable biologically active compounds, specifically, diterpenes.2 Several naturally occurring dietary and non-dietary phytochemicals have shown enormous potential in the prevention and treatment of several cancers, especially those of the gastrointestinal tract. Diterpenoids, are a large group of phytochemicals, traditionally used for medicinal purposes in India and China and are currently explored as anticancer agents in clinical trials.
The abietane diterpenes 7α,6β-dihydroxyroyleanone (P. madagascariensis), 6,7-dehydroroyleanone (P. madagascariensis), 7α-acetoxy-6β-hydroxyroyleanone (P. grandidentatus and P. madagascariensis) parvifloron D (P. ecklonii) are examples of cytotoxic molecules obtained with different extraction methods and solvents from Plectranthus spp.4,5
The potential role of these naturally occurring diterpenoids, in the chemoprevention and treatment of liver tumors is a key point in this work.
The in vitro effects of these agents and related cellular and molecular mechanisms are herein highlighted. The potential challenges and future directions involved in the advancement of these potential natural compounds in the chemoprevention and therapy of human cancers are understudy.

References:
[1] Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J (2011) S Afr J Bot 77: 947-959
[2] Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ (2006) J Ethnopharmacol 103:1-24
[3] Gaspar-Marques C, Rijo P, Simões MF, Duarte MA, Rodriguez B (2006) Phytomedicine 13:167-271.
[4] Matias D, Nicolai M, Saraiva L, et al. (2019) ACS Omega 4 (5): 8094–8103.
[5] Garcia C, Silva CO, Monteiro CM, et al. (2018) Future Med Chem 1 (10): 1177–1189.

P8: Diet impact on type 2 Diabetics an initial review

Carla Pires[a], João Gregório[a]

[a]CBIOS, Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Campo Grande, Lisboa, Portugal
E-mail: p5558@ulusofona.pt, joao.gregorio@ulusofona.pt

Diabetes is the 7th leading cause of death, affecting 422 million of adults in 2016. 9.2% of the Portuguese population is diabetic: 59.8% overweight and 22.1% obese [1-2]. Type 2 diabetes (T2D) results from the ineffective use of insulin in adults, promoting hyperglycemia. T2D accounts for 90% of all cases of diabetes and may remain undiagnosed for numerous years. Among other, unbalanced diet, overweight and obesity increases the risk of T2D [1]. Besides regular glycemic control, monitoring glycated haemoglobin (HbA1c) are recommended to monitor T2D [3]. HbA1c "reflects the average blood glucose concentration over the past few weeks" [1]. To identify and analyze reviews about the impact of diet on the control of T2D during 2019. PRISMA criteria were followed. Timeframe: 2019 (1year). Keywords: ["diabetes" and "type 2" and "diet" and "control"]. PubMed and SciELO were screened. Inclusion criteria: reviews describing impacts/outputs of diet on the control of T2D. Exclusion criteria: other topics and repeated studies. PubMed (n=74 reviews): 21 selected. SciELO (n=6 studies): 0 selected. Overall, 2 reviews confirmed that diets related to weight loss of >5% may improve glycaemic control and HbA1c in T2D, supporting a similar glycemic reduction to those promoted by the addition of oral antidiabetics. Three reviews identified that a healthy diet (e.g. avoiding saturated fatty acids) and physical activity are among the most relevant factors to positively control T2D. Fifteen reviews supported the influence of specific diets or foods on the positive management of T2D. Diets (n=9): palaeolithic diet (n=1), popular diets (low-carbohydrate, ketogenic or vegan diet) (n=4), low caloric (n=1), diets capable of modulating gut microbiota (dietary fiber or polyphenols) (n=1) and Mediterranean diet (n=2). Foods with demonstrated positive effect (n=3): green tea (n=1), zinc (n=1) and pistachios (n=1). Foods with potential positive effect (n=3): foods rich in polyunsaturated fatty acids (e.g. fish, fish and vegetable oils or nuts) (n=1), foods rich in anthocyanins and flavan-3-ols (e.g. some fruits) (n=1) and probiotic yogurt (n=1). One review discussed cultural/personal factors that may influence adherence to a healthy diet (e.g. honey consumption due religious values). A healthy diet, especially those related to weight loss contributes for the management of T2D. Dietary habits (e.g. consumption of certain foods) and physical activity may positively support glycemic control, since weight loss may be favored. It seems advisable that health professionals supervise the impletion of diets to minimize the potential risk of hypoglycemia. Study limitations: The number of screened keywords and databases was limited, and a restricted timeframe was assessed. The methodologies of the selected reviews were not individually evaluated. Limitations may have somewhat influenced study conclusions.

References:
[1] WHO. (2016). Global Report on Diabetes. ISBN:9789241565257.
[2] WHO. (2016). Country Profiles: Portugal. https://www.who.int/diabetes/country-profiles/prt_en.pdf
[3] Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee, et al. (2018). Targets for Glycemic Control. Can J Diabetes. 42(1):S42-S46.

List of participants

Adriana Tavares Costa
Alice de Jesus Carinhas Dias
Aline Solangei Felix Ambrosio
Ana Afonso
Ana Isabel Estorninho Trindade
Ana Margarida Fiuza Martins
Ana Marta Simões Ferreira
Ana Rita Martins Nunes
Anaísa Filipa Gomes da Silva
Andreia Filipa Garcia Dinis
Andy James Sousa Prioste
Assima Abdul Raimo Cassemo
Augusta Teresa António
Beatriz Eliana Canto Neves
Beatriz Isabel Ferreira Marques
Bruna Catarina Oliveira Raposo
Bruna Leticia Brabo da S. Cruz
Bruna Sousa Mota Minhoto
Carolina Gasparinho
Catarina Alexandra Santos Lucas
Catarina Ferreira Batista
Catarina Leandro Sequeira Amaro
Catarina Micaela Alves Pacheco
Catarina Rita Tome Martins
Catarina Saraiva Eixa dos Santos Leite
Dalila Caires Diniz
Damião José Mendes da Silva Clemente
Daniela Alexandra Quá Ferreira
Daniela Amaral Alves
Daniela Filipa Silva Gomes
Daniela Padeira Gonçalves Ferreira
Diogo Alexandre Pereira da Silva Reis
Diogo Ribeiro de Azevedo Dias
Diogo Silvestre Borges de Carvalho
Eduardo Jorge Ventura Martins
Elizabeth Benvindo Pereira Moreno
Fabiana Tâmega
Fátima Rodrigues Ariés
Flávia Micaela Marques Neca
Gabriel Nogueira Mendonça costa
Helena Sofia Cordeiro Lopes
Inês Barcelos Bandarra dos Santos
Inês Quental do Vale Van-zeller
Iris Guerreiro
Ivona de Jesus Andrade Eduardo dos Santos
Jacinthe Côté
Jade Bilhar
Jaqueline Ribeiro Serafim da Silva Lecoq
Jennyfer Lisseth Ruiz Castillo
Joana Beatriz Pinto Rodrigues
Joana Filipa Agostinho Borges
Joana Filipa Martins Viegas
Joana Isabel Martins Galhardas de Moura
Joana Matos da Cruz Marcos
João Gabriel Varela Madureira
Júlia Lopes dos Santos Marques
Kairon de Brito Santos
Laura Maria Marques Martins
Laurinda Simões
Leandra Vieira
Leonor Manuel Gomes
Leticia Vasconcelos Araújo
Liliana Esteves Henriques
Lucas Marcelino Biral Mendes
Luiana Costa
Mafalda Alves Magalhães de Figueiredo Clara
Maria Beatriz Daniel Miguez Mendonça
Maria do Carmo Amaral
Maria Fernanda Fraga Massoni
Maria João Ferreira de Oliveira
Mariana Lopes Aleixo Mendonça
Mariana Pestana Batalha
Marta Santos
Marta Vieira da Silva Figueira
Matilde Cardoso Mira
Mónica Alexandra e Silva Monteiro
Mónica Paula Dinis Lourenço
Paula Alexandra Cardoso dos Santos Clemente
Pedro Miguel Rodrigues Ribeiro
Raquel Sofia Miguel Carriço
Rita Alexandra da Silva Lucas
Rita Caparica
Rui Alexandre Santos de Mendonça Vaz
Samanta Reis de Carvalho
Sara Sofia Alves Martinho
Sofia Ramos Falcão Lopes
Suéria Marina Luis Monteiro
Tânia Sofia Gomes dos Santos
Tatiana Alexandra Sousa Fontes
Tatiana Isabel da Cruz Frieza
Tatiana Matos Ferreira
Tatiana Patrícia Henriques Pinto
Telma Marisa Fonseca Sêco
Teresa Viveiros das Neves Moreira
Thalita Lippi pereira dos Santos
Tiffany Freitas
Vanessa Priscilla Guedes Campff
Ximena Eusébia Calero