

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Dissertações – 2024



Trabalho de Conclusão

Título: Avaliação da atividade farmacológica sobre o SNC e da toxicidade de infuso de partes aéreas de *Piper mikanianum* Steudt Kunt

Autor: PATRICIA JANAINA VOIGT

Abreviatura: VOIGT, P. J.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 25/03/2024

Resumo: A espécie *Piper mikanianum* Steudt Kunt, conhecida popularmente como pariparoba, tem sido utilizada na forma de chá, a partir do infuso das suas folhas, para dor de dente, dor de estômago, finalidades antissépticas entre outros. Ainda, o uso milenar de plantas medicinais demonstrou que determinadas plantas apresentam substâncias perigosas, e devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. Assim, este estudo propõe caracterizar os metabólitos presentes no extrato aquoso de *P. mikanianum*, além de avaliar a toxicidade in vitro (em linhagem VERO), a toxicidade aguda e os efeitos centrais do referido extrato, em camundongos swiss. A caracterização da matéria-prima vegetal e do extrato liofilizado foi realizada por meio de análise fitoquímica preliminar e de análise cromatográfica, respectivamente. O teor de compostos fenólicos totais no infuso liofilizado foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O rendimento do extrato aquoso liofilizado de *P. mikanianum* foi de 12,48%, a partir de 33,161[5]g de folhas secas trituradas. A triagem fitoquímica indicou a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides e saponinas. O teor de compostos fenólicos foi de 0,1848% $\pm$ 0,02189 m/v expressos em equivalente de pirogáolol. Foi obtido o fingerprint do extrato aquoso liofilizado, por UPLC-DAD. A análise dos espectros absorção no ultravioleta (200 nm a 400nm) sugeriu a presença de flavonoides, caracterizados pela existência de dois máximos de absorção. Os resultados dos ensaios de toxicidade em células VERO indicaram baixa citotoxicidade do extrato testado, sendo esta mais acentuada nos ensaios que envolvem viabilidade lisossomal. No teste de toxicidade aguda, os camundongos swiss não apresentaram sinais de toxicidade, preconizados pela normativa 423 (OECD, 2001). Na avaliação farmacológica, no teste de locomoção, não foi observada diferença significativa frente ao controle, porém no experimento de suspensão pela cauda apresentou comportamento do tipo antidepressivo, nas concentrações de 100 e 300 mg/kg. Portanto, os resultados obtidos sugeriram segurança de uso e potencial para desenvolvimento de fitomedicamentos, impulsionando o aprofundamento do estudo.

Palavras-Chave: Extrato aquoso; Pariparoba; Plantas medicinais; Ensaios toxicológicos pré-clínicos

Abstract: A espécie *Piper mikanianum* Steudt Kunt, conhecida popularmente como pariparoba, tem sido utilizada na forma de chá, a partir do infuso das suas folhas, para dor de dente, dor de estômago, finalidades antissépticas entre outros. Ainda, o uso milenar de plantas medicinais demonstrou que determinadas plantas apresentam substâncias perigosas, e devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. Assim, este estudo propõe caracterizar os metabólitos presentes no extrato aquoso de *P. mikanianum*, além de avaliar a toxicidade in vitro (em linhagem VERO), a toxicidade aguda e os efeitos centrais do referido extrato, em camundongos swiss. A caracterização da matéria-prima vegetal e do extrato liofilizado foi realizada por meio de análise fitoquímica preliminar e de análise cromatográfica, respectivamente. O teor de compostos fenólicos totais no infuso liofilizado foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O rendimento do extrato aquoso liofilizado de *P. mikanianum* foi de 12,48%, a partir de 33,161[5]g de folhas secas trituradas. A triagem fitoquímica indicou a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides e saponinas. O teor de compostos fenólicos foi de 0,1848% $\pm$ 0,02189 m/v expressos em equivalente de pirogáolol. Foi obtido o fingerprint do extrato aquoso liofilizado, por UPLC-DAD. A análise dos espectros absorção no



ultravioleta (200 nm a 400nm) sugeriu a presença de flavonoides, caracterizados pela existência de dois máximos de absorção. Os resultados dos ensaios de toxicidade em células VERO indicaram baixa citotoxicidade do extrato testado, sendo esta mais acentuada nos ensaios que envolvem viabilidade lisossomal. No teste de toxicidade aguda, os camundongos swiss não apresentaram sinais de toxicidade, preconizados pela normativa 423 (OECD, 2001). Na avaliação farmacológica, no teste de locomoção, não foi observada diferença significativa frente ao controle, porém no experimento de suspensão pela cauda apresentou comportamento do tipo antidepressivo, nas concentrações de 100 e 300 mg/kg. Portanto, os resultados obtidos sugeriram segurança de uso e potencial para desenvolvimento de fitomedicamentos, impulsionando o aprofundamento do estudo.

Keywords: Extrato aquoso; Pariparoba; Plantas medicinais; Ensaios toxicológicos pré-clínicos

Orientador: JULIANE DEISE FLECK

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287678>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO, DOR ESCORES E QUALIDADE DE VIDA EM USUÁRIOS QUE RECEBERAM GABAPENTINA E PREGABALINA PARA O TRATAMENTO DE DORES CRÔNICAS E NEUROPÁTICAS

Autor: JULIA PALMEIRO ORSI

Abreviatura: ORSI, J. P.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 01/04/2024

Resumo: A gabapentina e a pregabalina são fármacos que possuem importância no tratamento da dor crônica, uma vez que, ao ligarem-se às subunidades auxiliares 2--1 dos canais de cálcio, medeiam efeitos analgésicos. Atribui-se também a esses fármacos como mecanismo de ação a diminuição dos níveis de glutamato, interação com a região N terminal dos canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK), diminuição da ativação da ínsula, inibição da inflamação mediada pela proteína caixa de grupo nuclear de alta mobilidade – 1 (HMGB1) e associação a N-metil-D-aspartato (NMDAR). Cita-se também a capacidade desses fármacos atuarem atenuando ou instigando o estresse oxidativo (EO), sendo esse caracterizado pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, podendo gerar ativação de fatores de transcrição regulados através de mecanismos redoxsensíveis. Nesse sentido, enzimas a superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) atuam como defesas antioxidantes, buscando atenuar o desequilíbrio. Um processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à injúria celular, e as interleucinas pró e anti-inflamatórias envolvem-se no fenômeno que, muitas vezes, acaba sendo responsável por sintomas dolorosos. Esse trabalho objetiva avaliar e relacionar níveis de EO e de inflamação com escores da dor e com a qualidade de vida de usuários portadores de dor crônica que administrem gabapentina ou pregabalina para tal patologia. Para tal, foram avaliados 23 usuários de gabapentina (4 homens; idade $59,1 \pm 10,8$) e 23 de pregabalina (6 homens; idade de $61,1 \pm 12$). Verificou-se correlação positiva para pregabalina entre níveis de IL-6 e “QV Global” e de IL-10 e “Relacionamento”; entre os níveis de SOD e o “Domínio Físico” e “QV Global”; entre SOD e a “melhora proporcionada pelo tratamento”; e entre GPx e o Domínios “Psicológico” e “Social”. Por outro lado, para pregabalina observou-se correlação negativa entre níveis de SOD e “Humor”, “Trabalho” e “Habilidade de apreciar a vida”; entre SOD e níveis de Interleucina 10 (IL-10); e entre níveis de GPx e “média de dor”. Para o fármaco gabapentina, observou-se correlação negativa entre SOD e a “dor mais fraca” e entre SOD e Interleucina-6 (IL-6). Concluiu-se que níveis baixos ou altos das enzimas SOD e GPx podem influenciar negativamente ou positivamente na inflamação, nos índices de dor e na qualidade de vida dos usuários, numa correlação inversamente proporcional. Considerando a escala de adesão Morisky Green, para ambos os fármacos os usuários classificaram-se mais como “Aderentes” e menos como “Moderada adesão”. Também no que tange a adesão, porém considerando o Brief Medication Questionnaire (BMQ), para gabapentina, há mais pacientes classificados como “Provável alta adesão” e menos pacientes classificados como “Moderada Adesão”; e para pregabalina há mais pacientes classificados como “Moderada adesão” e menos pacientes classificados como “Provável baixa adesão” ou “alta adesão”. Ainda, os usuários de gabapentina e pregabalina demonstraram que a intensidade de melhora causada pelo uso dos fármacos foi superior, em média, a 60%, indicando que a administração dos mesmos proporciona melhora da qualidade de vida de ambos os grupos.

Palavras-Chave: Estresse oxidativo; Inflamação; Dor crônica; Gabapentina; Pregabalina

Abstract: Gabapentin and pregabalin are drugs that are important in the treatment of chronic pain, since, by binding to the 2--1 auxiliary subunits of calcium channels, they mediate analgesic effects. The mechanism of action of these drugs



is also attributed to the decrease in glutamate levels, interaction with the N-terminal region of BK potassium channels, decreased activation of the insula, inhibition of inflammation mediated by HMGB1 protein and association with N-methyl-D-aspartate (NMDAR). The ability of these drugs to act by attenuating or instigating oxidative stress (OS) is also mentioned, being the OS characterized by the imbalance between oxidizing and antioxidant compounds, which can generate activation of transcription factors regulated through redoxsensitive mechanisms. In this sense, enzymes such as SOD and GPx act as antioxidant defenses, seeking to mitigate the imbalance. An inflammatory process occurs as a tissue response to cellular injury, and pro- and anti-inflammatory interleukins are involved in the phenomenon, which often ends up being responsible for painful symptoms. This work aims to evaluate and relate OS and inflammation levels with pain scores and quality of life. To this end, 23 users of gabapentin (4 men; age 59.1 ± 10.8) and 23 users of pregabalin (6 men; age 61.1 ± 12) were evaluated. There was a positive correlation for pregabalin between levels of IL-6 and "Global QoL" and IL-10 and "Relationship"; between the SOD levels and the "Physical Domain" and "Global QoL"; between SOD and the "improvement provided by treatment"; and between GPx and the "Psychological" and "Social" Domains. On the other hand, for pregabalin, a negative correlation was observed between SOD levels and "Mood", "Work" and "Ability to enjoy life"; between SOD and IL-10 levels; and between GPx levels and "average pain". For the drug gabapentin, a negative correlation was observed between SOD and "weaker pain" and between SOD and IL-6. It was concluded that low or high levels of SOD and GPx enzymes can negatively or positively influence inflammation, pain levels and quality of life of users, in an inversely proportional correlation. Considering the Morisky Green adherence scale, for both drugs, users classified themselves more as "Adherent" and less as "Moderate adherence". Also regarding adherence, however considering the Brief Medication Questionnaire (BMQ), for gabapentin, there are more patients classified as "Probable high adherence" and fewer patients classified as "Moderate Adherence"; and for pregabalin there are more patients classified as "Moderate adherence" and fewer patients classified as "Probable low adherence" or "high adherence". Furthermore, users of gabapentin and pregabalin demonstrated that the intensity of improvement caused by the use of the drugs was greater, on average, than 60%, indicating that their administration provides an improvement in the quality of life of both groups.

Keywords: Oxidative stress; Inflammation; Chronic pain; Gabapentin; Pregabalin

Orientador: MAGDA SUSANA PERASSOLO

Disponível no acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287622>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS HERBICIDAS 2,4- DICLOROFENOXIACÉTICO E GLIFOSATO UTILIZADOS ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO NO MODELO C. ELEGANS

Autor: PAMELLA PATRICIA FUZZER FIGUEIREDO

Abreviatura: FIGUEIREDO, P. P. F.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/07/2024

Resumo: O Brasil vem se sobressaindo na comercialização e consumo de herbicidas. Dentre eles, destacam-se os herbicidas glifosato e 2,4- diclorofenoxiacético (2,4D), ambos de amplo uso no controle agrícola, usados tanto de forma isolada quanto em associação. O modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), é um modelo experimental que, apresenta sistema completo, é de fácil manipulação e manutenção. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do glifosato e do 2,4D isoladamente e em associação no modelo *C. elegans*. Os nematoides foram expostos de forma crônica a 4 concentrações diferentes dos herbicidas comerciais isolados e em associação (0,115 mg/mL a 0,925 mg/mL, para glifosato e de 1,046 mg/mL a 8,375 mg/mL para o 2,4D), em seguida eles foram dispostos em placas de NGM (Nematode Growth Medium) e avaliados de acordo com cada ensaio proposto, onde consideramos significativo qualquer valor com $p < 0,05$. A partir do ensaio de sobrevivência, foi possível determinar a CL50 (concentração letal 50) de cada herbicida e de suas misturas, sendo 0,660mg/mL para o glifosato e 0,164mg/mL quando o mesmo associado ao 2,4D. Para o 2,4D isolado a CL50 foi de 9,410mg/mL e 3,011mg/mL quando associado com o glifosato. No ensaio de desenvolvimento corporal, se observou uma redução significativa no comprimento dos nematoides expostos ao glifosato a partir da concentração 0,231 mg/mL e nos nematoides expostos ao 2,4D somente na última concentração testada (8,375 mg/mL). Entretanto, quando os nematoides foram expostos a mistura houve redução significativa no desenvolvimento desde a primeira concentração testada. No ensaio de reprodução quando expostos ao glifosato obtivemos diminuição significativa do número de ovos na concentração 0,925 mg/mL (C4) e para o 2,4-D não foi observado diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Entretanto, quando expostos ao glifosato e 2,4D em associação foi observado redução significativa no número de ovos a partir da concentração 3 (C3) (0,462 mg/mL de glifosato + 4,187 mg/mL de 2,4D). Quanto ao ensaio neonatal, a exposição dos ovos aos herbicidas em separado não apresentou resultados significativos no ensaio de sobrevivência, porém no desenvolvimento apresentou diferença significativa na concentração 4 (C4) (3,011 mg/mL) do 2,4D. Em mistura foi possível observar redução significativa na sobrevivência dos ovos expostos a última concentração (0,925 mg/mL de glifosato + 8,375 mg/mL de 2,4D), bem como no parâmetro desenvolvimento, onde houve diferença significativa nas concentrações 1 e 3 da mistura destes herbicidas. Diante destes achados, é possível inferir que os herbicidas quando em associação apresentam maior toxicidade no modelo *C. elegans*. Além disso, através do modelo probabilístico Highest Single Agent (HSA), foi verificado um efeito sinérgico quando avaliado o parâmetro sobrevivência, indicando que na associação de determinadas concentrações de glifosato e 2,4D o efeito tóxico é significativamente mais pronunciado. A utilização destes herbicidas é frequente em lavouras, com isso, é evidente a importância da continuidade de pesquisas que envolvam o estudo de substâncias em associação, para que seja possível obter dados mais completos e conclusivos quanto aos riscos de contaminação em organismos não alvos, e que podem afetar o ecossistema e a saúde humana.

Palavras-Chave: Glifosato; 2,4- Diclorofenoxiacético; herbicidas; sinergia; mistura; *C. elegans*



Abstract: Brazil has excelled in the commercialization and consumption of herbicides. These include the herbicides glyphosate and 2,4Dichlorophenoxyacetic acid (2,4D), both of which are widely used for agricultural control, both alone and in combination. The *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an experimental model that has a complete system and is easy to manipulate and maintain. Therefore, the present study was designed to evaluate the toxicity of glyphosate and 2,4D alone and in combination in the *C. elegans* model. The nematodes were chronically exposed to 4 different concentrations of commercial herbicides alone and in combination (0.115 mg/mL to 0.925 mg/mL for glyphosate and 1.046 mg/mL to 8.375 mg/mL for 2,4D). They were then placed on NGM (nematode growth medium) plates and evaluated according to each proposed assay, with any value at $p < 0.05$ considered significant. From the survival test, it was possible to determine the LC50 (lethal concentration 50) of each herbicide and their mixtures, which was 0.660mg/mL for glyphosate and 0.164mg/mL when it was combined with 2,4D. The CL50 for 2,4D alone was 9.410mg/mL and 3.011mg/mL when combined with glyphosate. In the body development test, there was a significant reduction in the length of nematodes exposed to glyphosate from the concentration of 0.231 mg/mL and in nematodes exposed to 2,4D only at the last concentration tested (8.375 mg/mL). However, when the nematodes were exposed to the mixture, there was a significant reduction in development from the first concentration tested. In the reproduction test, when exposed to glyphosate, there was a significant reduction in the number of eggs at a concentration of 0.925 mg/mL (C4) and for 2,4D there was no significant difference compared to the control group. However, when exposed to glyphosate and 2,4D in combination, a significant reduction in the number of eggs was observed starting at concentration 3 (C3) (0.462 mg/mL glyphosate + 4.187 mg/mL 2,4D). In the neonatal test, exposure of eggs to the herbicides separately did not show significant results in the survival test, but there was a significant difference in development at concentration 4 (C4) (3.011 mg/mL) of 2,4D. In a mixture, it was possible to observe a significant reduction in the survival of eggs exposed to the last concentration (0.925 mg/mL glyphosate + 8.375 mg/mL 2,4D), as well as in the development parameter, where there was a significant difference in concentrations 1 and 3 of the mixture of these herbicides. Based on these results, it can be concluded that the herbicides, when combined, are more toxic to the *C. elegans* model. Furthermore, using the Highest Single Agent (HSA) probabilistic model, a synergistic effect was found when evaluating the survival parameter, indicating that when certain concentrations of glyphosate and 2,4D are combined, the toxic effect is significantly more pronounced. The use of these herbicides in crops is widespread, so it is clear that it is important to continue studying the substances in combination in order to obtain more complete and conclusive data on the risks of contamination in non target organisms that may affect the ecosystem and human health.

Keywords: Glyphosate;2,4- Dichlorophenoxyacetic acid; herbicides; synergy; mixture; *C.elegans*

Orientador: MARIELE FEIFFER CHARAO

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287879>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL INFLAMATÓRIO, EM PACIENTES COM DORES CRÔNICAS TRATADOS COM CLORIDRATO DE AMITRIPTILINA E/ OU CLORIDRATO DE DULOXETINA

Autor: BRUNA SCHERER SEIBERT

Abreviatura: SEIBERT, B. S.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 26/03/2024

Resumo: A dor crônica resulta de processos complexos como inflamação, mudanças no sistema nervoso central aumento do estresse oxidativo (EO) devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e os antioxidantes. Medicamentos como o cloridrato de amitriptilina (AMT) e duloxetina (DLX), frequentemente utilizados para tratar dores crônicas, mostram melhorias na qualidade de vida dos pacientes, possivelmente relacionadas à redução de inflamação e consecutivamente da dor. Portanto, o objetivo é investigar o impacto dos fármacos cloridrato de amitriptilina (AMT) e duloxetina (DLX) no estresse oxidativo, perfil inflamatório e seus efeitos na dor crônica e na qualidade de vida dos pacientes. Para isto foram aplicados questionários estruturados e validados: Inventário Breve de Dor – forma reduzida Brief Pain Inventory, para analisar a dor e intensidade de melhora proporcionada pelo tratamento; e WHOQOL-BREF versão abreviada do WHOQOL-100 para verificar a qualidade de vida autorreferenciada pelos pacientes, bem como, a adesão ao tratamento foi avaliada através da escala de Morisky-green e Brief Medication Questionnaire(BMQ). E para identificar os parâmetros de estresse oxidativo e perfil de inflamação foram feitas coletas de sangue e analisadas as enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e verificado o poder antioxidante total (FRAP). O perfil inflamatório foi analisado através do kit BD™ CBA Human Th1/Th2/Th17. Foram avaliados 46 pacientes, sendo 23 de cada um dos medicamentos, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de duloxetina. Dentre os pacientes de ambos os grupos e para os dois métodos de avaliação, apresentam-se divididos em aderentes e baixa adesão. Nos pacientes que utilizam o cloridrato de amitriptilina verificou-se correlação significativa entre dor e estresse oxidativo, correlação negativa (SOD e GPx, dor no momento da coleta e pior dor sentida, melhora proporcionada pelo tratamento, interferência da dor no humor, trabalho e relacionamento com as pessoas). Em relação ao estresse oxidativo e à qualidade de vida, verifica-se diferença entre GPx e o domínio meio ambiente (neste caso correlação positiva). Assim como ao correlacionar a interleucina (IL) 17A (pró-inflamatória), tanto relacionado à dor referida no momento da coleta (correlação negativa), quanto com a qualidade de vida impactada no domínio físico e QV-global (correlação positiva). Já em pacientes tratados com cloridrato de duloxetina verificou-se que a IL-10 (anti-inflamatória) influiu na qualidade de vida dos pacientes ao comparar o grupo AMT, uma vez que esta interleucina não apareceu neste grupo. Quando correlacionado o estresse oxidativo e a qualidade de vida, a enzima GPx teve correlação positiva no domínio psicológico. E para as citocinas e estresse oxidativo, verificou-se para IL-6 (pro-inflamatória) e SOD correlação negativa. Observa-se a importância das medicações no manejo da dor, sugerindo benefícios como aumento da expressão de enzimas antioxidantes e potencial ação anti-inflamatória. E ressalta-se também as boas correlações encontradas no uso do cloridrato de amitriptilina, medicação que está disponível na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde, sendo disponibilizado de forma gratuita, abrangendo assim o acesso ao tratamento.

Palavras-Chave: Amitriptilina; Duloxetina; Inflamação; Estresse oxidativo; Dor

Abstract: Chronic pain results from complex processes such as inflammation, changes in the central nervous system and increased oxidative stress (OS) due to the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS)



and antioxidants. Medications such as amitriptyline hydrochloride (AMT) and duloxetine (DLX), frequently used to treat chronic pain, show improvements in patients' quality of life, possibly related to the reduction of inflammation and consequently pain. Therefore, the objective is to investigate the impact of the drugs amitriptyline hydrochloride (AMT) and duloxetine (DLX) on oxidative stress, inflammatory profile and their effects on chronic pain and patients' quality of life. For this, structured and validated questionnaires were applied: Brief Pain Inventory – reduced form Brief Pain Inventory, to analyze pain and intensity of improvement provided by the treatment; and WHOQOL-BREF abbreviated version of WHOQOL-100 to verify the patients' self-referenced quality of life, as well as treatment adherence was assessed using the Morisky-green scale and Brief Medication Questionnaire (BMQ). And to identify the oxidative stress parameters and inflammation profile, blood samples were taken and the antioxidative enzymes were analyzed: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and the total antioxidant power (FRAP) was verified. The inflammatory profile was analyzed using the BD™ CBA Human Th1/Th2/Th17 kit. 46 patients were evaluated, 23 of each of the medications, amitriptyline hydrochloride and duloxetine hydrochloride. Among the patients in both groups and for the two assessment methods, they were divided into adherent and low adherent. In patients using amitriptyline hydrochloride, there was a significant correlation between pain and oxidative stress, negative correlation (SOD and GPx, pain at the time of collection and worst pain felt, improvement provided by treatment, interference of pain in mood, work and relationships with the people). Oxidative stress and quality of life, there is a difference between GPx and the environment domain (in this case positive correlation). As well as correlating interleukin (IL) 17A (pro-inflammatory), both related to the pain reported at the time of collection (negative correlation), and with the quality of life impacted in the physical domain and global QoL (positive correlation). In patients treated with duloxetine hydrochloride, it was found that IL-10 (anti-inflammatory) influenced the patients' quality of life when comparing the AMT group, since this interleukin did not appear in this group. When oxidative stress and quality of life were correlated, the GPx enzyme had a positive correlation in the psychological domain. And for cytokines and oxidative stress, a negative correlation was found for IL-6 (pro-inflammatory) and SOD. The importance of medications in pain management is observed, suggesting benefits such as increased expression of antioxidant enzymes and potential anti-inflammatory action. And it is also worth highlighting the good correlations found in the use of amitriptyline hydrochloride, a medication that is available in the National List of Essential Medicines (RENAME) of the Ministry of Health, being made available free of charge, thus covering access to treatment.

Keywords: Amitriptyline; Duloxetine; Inflammation; Oxidative stress; Pain

Orientador: MAGDA SUSANA PERASSOLO

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287623>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE CONSERVANTES DE PRODUTOS COSMÉTICOS UTILIZANDO O MODELO ALTERNATIVO CAENORHABDITIS ELEGANS

Autor: STEFANI PETTER KIELING

Abreviatura: KIELING, S. P.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 28/03/2024

Resumo: A cada ano há um aumento considerável no consumo de cosméticos e não há consenso entre os países em relação à liberação do uso das substâncias/aditivos presentes nos cosméticos, a exemplo dos conservantes. O consumo elevado de conservantes causa uma exposição de forma direta e indireta nos seres humanos, fauna e flora. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é realizar a avaliação toxicológica dos conservantes metilparabeno (MP), propilparabeno (PP) e imidazolidinil ureia (IU), em separado e conjuntamente, utilizando o modelo alternativo *C. elegans*. Os conservantes foram preparados em etanol e testados nas concentrações de 50 a 500 µg/mL para MP; 25 a 300 µg/mL para PP; 1,5 mg/mL, a 7,5 mg/mL para IU. Para os ensaios foi utilizada a cepa tipo selvagem N2. Após sincronização, 100 nematoides foram tratados. Posteriormente, os mesmos foram colocados em placas de petri contendo meio NGM e *E. coli* OP50. Foi realizada a avaliação da sobrevivência após 48 horas do tratamento com auxílio de estereomicroscópio. A avaliação do desenvolvimento foi realizada 48 horas após o tratamento, medindo-se 60 nematoides por tratamento em estereomicroscópio acoplado a câmera fotográfica. Os experimentos foram repetidos 3 vezes em duplicata. O comprimento corporal dos nematoides foi medido através do software ImageJ. Os conservantes MP e IU não apresentaram toxicidade em *C. elegans*, não havendo morte significativa dos nematoides quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e não foi observada alteração no desenvolvimento ($p < 0,05$). Entretanto, quando os nematoides foram tratados com PRP foi possível observar morte significativa sendo observada uma concentração letal (CL50) de 205,56 µg/mL e diminuição significativa no tamanho dos nematoides nas concentrações de 225 µg/mL e 300 µg/mL quando comparado ao grupo controle. Quando testados em associação com MP houve potencialização da toxicidade caracterizando efeito sinérgico quando foram utilizados quatro modelos de toxicidade distintos, ZIP, HSA, Bliss e Lowe. A concentração de maior efeito sinérgico foi na mistura binária com concentração de 150 µg/mL de MP e PP. Nos ensaios com a mistura ternária foram utilizadas as mesmas concentrações de MP e PP, e 6,0 mg/mL para IU que é a maior concentração permitida pela ANVISA em produtos cosméticos. Os ensaios demonstraram incremento importante da toxicidade por efeito sinérgico para o PP em concentração de 150 µg/mL e diferentes concentrações de MP. É possível concluir que os conservantes apresentam efeitos tóxicos distintos no modelo *C. elegans*, e destaca-se os riscos à saúde pública associados à exposição a esses conservantes, enfatizando a necessidade de estudos adicionais.

Palavras-Chave: sinergia; toxicidade; *C. elegans*; imidazolidinil ureia; metilparabeno; propilparabeno

Abstract: Every year there is a considerable increase in the consumption of cosmetics, and there is no consensus among countries regarding the release of the use of substances/additives present in cosmetics, such as preservatives. The high consumption of preservatives causes direct and indirect exposure to humans, fauna, and flora. Thus, the aim of this study is to perform toxicological evaluation using the alternative model *C. elegans* of the preservatives methylparaben (MP), propylparaben (PP), and imidazolidinyl urea (IU), separately and together. The preservatives were prepared in ethanol and tested at concentrations of 50 to 500 µg/mL for MP; 25 to 300 µg/mL for PP; 1.5 mg/mL to 7.5 mg/mL for IU. The wild-type strain N2 was used for the assays. After synchronization, 100 nematodes were treated.



Subsequently, they were placed on petri dishes containing NGM medium and *E. coli* OP50. Survival assessment was performed 48 hours after treatment using a stereomicroscope. Development assessment was conducted 48 hours after treatment, measuring 60 nematodes per treatment under a stereomicroscope coupled to a photographic camera. Experiments were repeated 3 times in duplicate. Nematode body length was measured using ImageJ software. The preservatives MP and IU showed no toxicity in *C. elegans*, with no significant nematode death compared to the control group ($p>0.05$), and no alteration in development was observed ($p>0.05$). However, when nematodes were treated with PP, significant death was observed with LC50 of 205.56 $\mu\text{g/mL}$ and significant reduction in nematode size at concentrations of 225 $\mu\text{g/mL}$ and 300 $\mu\text{g/mL}$ compared to the control group. When tested in combination with MP, there was a synergistic effect when tested four different toxicity models, ZIP, HSA, Bliss, and Lowe, especially in the binary mixture at a concentration of 150 $\mu\text{g/mL}$ of MP and PP. In trials with the ternary mixture, the same concentrations of MP and PP were used, added of 6.0 mg/mL IU. The assays demonstrated a significant increase in toxicity due to synergistic effect for PP at a concentration of 150 $\mu\text{g/mL}$ and different concentrations of MP. It is possible to conclude that preservatives showed distinct toxic effects in the *C. elegans* model, highlighting the risks to public health associated with exposure to these preservatives and emphasizing the need for additional studies.

Keywords: Synergy; toxicity; *C. elegans*; imidazolidinyl urea; methylparaben; propylparaben

Orientador: SIMONE GASPARIN VERZA

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287864>



Trabalho de Conclusão

Título: BIOMONITORAMENTO HUMANO DA EXPOSIÇÃO AOS PARABENOS USANDO URINA COMO MATRIZ BIOLÓGICA

Autor: CLOE DAGNESE LOREDO

Abreviatura: LOREDO, C. D.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/11/2024

Resumo: Os parabenos (PBs) são desreguladores endócrinos (DE) encontrados em produtos devido às suas propriedades antimicrobianas. Eles têm sido associados a distúrbios reprodutivos, câncer de mama e hipertensão. Este estudo teve como objetivo desenvolver um método analítico baseado em extração em fase sólida (SPE) seguida de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) para a quantificação simultânea de metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) e butilparabeno (BuP) em amostras de urina. Esta metodologia validada simplifica a extração por SPE padrão de cinco etapas para apenas três, eliminando as etapas de condicionamento e equilíbrio. Foram analisadas 100 amostras de urina. Utilizou-se 1 mL de urina, adicionadas de padrões internos deuterados, enzima -glucuronidase em tampão acetato de sódio (1M, pH 4,5) e incubou-se por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, a amostra foi adicionada a um cartucho Oasis HLB® sem condicionamento prévio, em apenas três etapas de SPE. Apenas 2 mL de solvente orgânico foram consumidos na extração. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Acquity UPLC BEH C18 com uma corrida cromatográfica de 6,5 minutos. A faixa linear foi de 2 a 800 ng/mL. A precisão intra-ensaio foi de 2,8-11,6%; a inter-ensaio foi de 0,7-7,1% e a exatidão foi de 94,8%-111,8%. Os rendimentos de extração variaram de 92,31-109,4%, com efeitos de matriz de -13,7 a -2,8%. PBs foram quantificados em todas as amostras de urina. Três indivíduos excederam a ingesta diária aceitável (IDA) recomendada para PrP, indicando um risco potencial à saúde (HQ 1,0) para este composto.

Palavras-Chave: Parabenos; Urina; Avaliação de risco; Biomonitoramento; SPE-LC-MS/MS

Abstract: This study describes a method for the simultaneous parabens (PBs) quantification in 100 urine volunteers residing in southern Brazil, using a three-step solid-phase extraction (SPE) with hydrophilic-lipophilic balance (HLB®) sorbent, with subsequent analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). This validated approach simplifies the standard five-step SPE process by eliminating the conditioning and equilibration steps. Target analytes included methylparaben (MeP), ethylparaben (EtP), propylparaben (PrP) and butylparaben (BuP). 100 urine samples were collected and analyzed. Urine samples (1 mL) were hydrolyzed with -glucuronidase acid solution, mixed with deuterated internal standards, and subjected to SPE. Analysis was performed using an UPLC BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 m), with a 6.5-minute chromatographic run. Intra-assay precision was 2.8–11.6 %, inter-assay precision was 0.7–7.1 %, and accuracy was 94.8 %–111.8 %. Extraction yields varied from 92.31–109.4%, with matrix effects ranging from -13.7 to -2.8. PBs were measured in all urine samples. A concerning proportion of three individuals exceeded the recommended ADI for PrP, indicating a potential health risk (HQ 1.0). These findings provide valuable insights into human exposure to PBs in southern Brazil, highlighting the need for further research to assess potential health risks.

Keywords: Parabens; SPE; Urine; Hair; Biomonitoring; Human exposure; HLB®; Risk assessment; UPLC-MS/MS.



Orientador: RAFAEL LINDEN

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/288675>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA O MONITORAMENTO DA FARMACOTERAPIA NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EMPREGANDO MICROAMOSTRAS DE PLASMA CAPILAR SECO

Autor: DEBORA RENATA MACALI OLIVEIRA

Abreviatura: MACALI OLIVEIRA, DEBORA RENATA

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/07/2024

Resumo: Em 2022, de acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, aproximadamente 24,5% dos brasileiros adultos com 18 anos ou mais foram diagnosticados com hipertensão arterial. O uso contínuo de anti-hipertensivos, aliado a mudanças no estilo de vida, é fundamental para o controle da hipertensão e representa uma meta prioritária para a redução das complicações associadas. A adesão à farmacoterapia é um fator crítico na resposta ao tratamento, e a disponibilidade de métodos diretos para sua avaliação pode trazer benefícios significativos para a prática clínica e o manejo dos pacientes. Este trabalho propôs o desenvolvimento e a validação de uma metodologia inovadora para a quantificação de cinco anti-hipertensivos, anlodipino, atenolol, enalapril, hidroclorotiazida e losartana em plasma capilar seco (DPS) em papel, utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC MS/MS). Também foi desenvolvida e validada uma metodologia para a determinação dos analitos em plasma obtido de sangue venoso, que serviu como método de referência para comparação e validação clínica dos resultados obtidos com a matriz alternativa. As amostras de plasma capilar seco foram obtidas através do dispositivo HealthID®. Três discos de 6 mm de diâmetro foram extraídos em duas etapas: inicialmente em meio aquoso com albumina 0,1%, seguido de extração com metanol. A análise foi realizada em um sistema UPLC-MS/MS, com separação em coluna de fase reversa octadecilsilica C18 a 40 °C, utilizando um gradiente de eluição com ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila, variando de 10% B a 90% B. A ionização foi realizada em fonte electrospray no modo positivo, exceto para a hidroclorotiazida. A metodologia foi validada com base em parâmetros de sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, efeito matriz e rendimento de extração. A corrida analítica teve duração de 10 minutos, sem a presença de picos interferentes nos tempos de retenção das amostras isentas dos analitos. Os métodos apresentaram linearidade no intervalo de 0,5 a 500 ng/mL para anlodipino e enalaprilato (metabólito ativo do enalapril), e de 1,0 a 1000 ng/mL para atenolol, hidroclorotiazida e losartana, com $r^2 > 0,99$ para todos os analitos e ajuste ponderal $1/x$. A precisão e exatidão do ensaio DPS foram adequadas, com coeficiente de variação (CV%) variando de 4,3% a 14,5% e exatidão de 86% a 112%. O padrão interno compensou de forma satisfatória o efeito matriz, com supressão ou aumento médio da ionização variando de -14,1% a +12,9%. Os analitos foram estáveis por três semanas em amostras DPS armazenadas em temperatura ambiente. A metodologia para dosagem em amostras de plasma obtido de sangue venoso envolveu preparo por precipitação de proteínas com ácido tricloroacético 25% e análise nas mesmas condições do UPLC MS/MS. Este ensaio apresentou precisão com CV% variando de 4,5% a 14,6% e exatidão de 89% a 113%, com efeito matriz aceitável variando de -13,3% a 11,9%. A validação clínica foi realizada com amostras de 72 pacientes em tratamento farmacológico, muitos dos quais utilizavam mais de um anti-hipertensivo em combinação. As concentrações corrigidas pelos cloretos nas amostras DPS apresentaram alta correlação ($r = 0,93$ a $0,98$) e representaram, em média, 95,9% a 115% das medidas plasmáticas. A partir do questionário Morisky-Green, identificou-se 21 pacientes com adesão moderada ou baixa, com concentrações de losartana, anlodipino e hidroclorotiazida inferiores em comparação ao grupo aderente ($p < 0,05$). Em conclusão, foi desenvolvida e validada com sucesso uma metodologia bioanalítica promissora para a avaliação da terapia e adesão a cinco anti-hipertensivos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde no Brasil, utilizando amostras de plasma capilar seco em papel.



Palavras-Chave: Hipertensão arterial sistêmica; adesão; anti-hipertensivos; plasma seco em papel

Abstract: In 2022, according to data from the Brazilian Ministry of Health, approximately 24.5% of Brazilian adults aged 18 years or older were diagnosed with arterial hypertension. Continuous use of antihypertensives, combined with lifestyle changes, is crucial for hypertension control and represents a priority goal for reducing associated complications. Adherence to pharmacotherapy is a critical factor in treatment response, and the availability of direct methods for its assessment can offer significant benefits for clinical practice and patient management. This study proposed the development and validation of an innovative methodology for quantifying five antihypertensives—amlodipine, atenolol, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan—in dried plasma spots (DPS) on paper, using ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC MS/MS). A methodology was also developed and validated for determining the analytes in plasma obtained from venous blood, which served as a reference method for comparison and clinical validation of the results obtained with the alternative matrix. Dried plasma spot samples were obtained using the HealthID® device. Three 6 mm diameter discs were extracted in two stages: first in aqueous solution with 0.1% albumin, followed by extraction with methanol. The analysis was conducted using a UPLC MS/MS system, with separation on an octadecylsilica C18 reverse-phase column at 40 °C, utilizing a gradient elution with 0.1% formic acid in water and acetonitrile, ranging from 10% B to 90% B. Ionization was performed in positive electrospray mode, except for hydrochlorothiazide. The methodology was validated based on sensitivity, specificity, linearity, precision and accuracy, matrix effect, and extraction yield. The analytical run lasted 10 minutes, with no interfering peaks at the retention times of analytes-free samples. The methods showed linearity in the range of 0.5 to 500 ng mL⁻¹ for amlodipine and enalaprilat (active metabolite of enalapril), and 1.0 to 1000 ng mL⁻¹ for atenolol, hydrochlorothiazide, and losartan, with $r^2 > 0.99$ for all analytes and 1/x weighting adjustment. The precision and accuracy of the DPS assay were adequate, with coefficient of variation (CV%) ranging from 4.3% to 14.5% and accuracy from 86% to 112%. The internal standard satisfactorily compensated for the matrix effect, with average ionization suppression or enhancement ranging from -14.1% to +12.9%. The analytes were stable for three weeks in DPS samples stored at room temperature. The methodology for plasma analysis from venous blood involved protein precipitation with 25% trichloroacetic acid and analysis under the same UPLC-MS/MS conditions. This assay showed precision with CV% ranging from 4.5% to 14.6% and accuracy from 89% to 113%, with an acceptable matrix effect ranging from -13.3% to 11.9%. Clinical validation was performed with samples from 72 patients undergoing pharmacological treatment, many of whom were using multiple antihypertensives in combination. Chloride-corrected concentrations in DPS samples showed high correlation ($r = 0.93$ to 0.98) and represented on average 95.9% to 115% of plasma measurements. The Morisky-Green questionnaire identified 21 patients with moderate or low adherence, with concentrations of losartan, amlodipine, and hydrochlorothiazide being lower compared to the adherent group ($p < 0.05$). In conclusion, a promising bioanalytical methodology was successfully developed and validated for evaluating therapy and adherence to five antihypertensives provided by the Brazilian Unified Health System, using capillary dried plasma spots.

Keywords: Systemic arterial hypertension; adherence; antihypertensive drugs; dried plasma on paper

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Disponível no acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287677>



Trabalho de Conclusão

Título: DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS PSICOATIVOS EM PLASMA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA AUTOMATIZADA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ASSOCIADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Autor: MARINA CAMARGO GALERA

Abreviatura: GALERA, MARINA C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 28/03/2024

Resumo: No Brasil, os medicamentos e as drogas ilícitas são responsáveis pela maior parte das intoxicações notificadas nos casos de tentativas de suicídio. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para identificar e quantificar compostos em amostras de plasma de pacientes após tentativa de suicídio, empregando extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (CLAE/EM-EM). Os analitos alvo foram amitriptilina, anfetamina, benzoilecgonina, carbamazepina, cocaetileno, cocaína, codeína, diazepam, fluoxetina, MDA, MDEA, MDMA, metanfetamina, morfina, nortriptilina, paroxetina, sertralina e venlafaxina. Amostras de plasma de 100 µL foram diluídas com ácido fosfórico 4% em água, adicionados de uma mistura de padrões-internos deuterados e extraídas utilizando cartuchos Oasis HLB® empregando um sistema automatizado ASPEC®. O método SPE compreendeu apenas três etapas: aplicação, lavagem e eluição. A coluna utilizada foi ACQUITY UPLC HSS C18 (150 x 2,1 mm, 1,8 µm) com corrida cromatográfica de 15 minutos. O tempo de extração automatizada foi de 24 minutos. Além dos compostos alvo, outros 182 compostos foram monitorados qualitativamente através de transições MRM e tempos de retenção. O método foi validado com base em diretrizes da Food and Drug Administration. O ensaio apresentou precisão intraensaio de 1,6-10,1% e precisão interensaio de 1,5-5,8%, A exatidão foi de 94,4-106,6%. O rendimento da extração variou de 14,6-78,7%. O efeito matriz foi de -15,9 a 13,3%. A estabilidade de congelamento-descongelamento variou de -6,1 a 11,5% e a estabilidade de 12 h em autoamostrador teve uma variação de -10,4 a 9,8%. O método foi aplicado em amostras de 50 pacientes que passaram por tentativa de suicídio, 28 amostras tiveram substâncias quantificadas, nestas, os compostos mais frequentemente quantificados, foram benzoilecgonina (60,7%), diazepam (50%) e cocaína (17,8%). Dentre estes 50 pacientes, 9 também tiveram amostras coletadas com dispositivo de microamostragem capilar Tasso+®, sendo encontradas as mesmas substâncias com maior prevalência, de 75%, 50% e 37,5% respectivamente. As concentrações em plasma capilar foram semelhantes às encontradas em plasma venoso. Os resultados do estudo demonstraram a aplicabilidade do método desenvolvido para quantificação e identificação de múltiplos analitos simultaneamente, com a velocidade e desempenho analítico necessários para toxicologia de emergência.

Palavras-Chave: Extração em fase sólida automatizada; HLB®; cromatografia líquida associada a espectrometria de massas; triagem toxicológica; tentativa de suicídio.

Abstract: In Brazil, drugs and illicit substances are major contributors to intoxications reported in suicide attempt cases. This study aimed to develop and validate a method for identifying and quantifying compounds in plasma samples from suicide attempt patients, utilizing solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC/MS-MS). Target analytes included amitriptyline, amphetamine, benzoylecgonine, carbamazepine, cocaethylene, cocaine, codeine, diazepam, fluoxetine, MDA, MDEA, MDMA, methamphetamine, morphine, nortriptyline, paroxetine, sertraline, and venlafaxine. Plasma samples (100 µL) were diluted with 4% phosphoric acid in water, mixed with deuterated internal standards, and subjected to extraction using Oasis HLB® cartridges via an automated ASPEC® system. The SPE procedure consisted of three steps: application, washing, and elution. Analysis was performed using



an ACQUITY UPLC HSS C18 column (150 x 2.1 mm, 1.8 μ m) with a 15-minute chromatographic run. The automated extraction duration was 24 minutes. In addition to the target compounds, 182 other compounds were qualitatively monitored using multiple reaction monitoring (MRM) transitions and retention times. Method validation followed guidelines from the Food and Drug Administration, yielding intra-assay precision of 1.6-10.1% and inter-assay precision of 1.5-5.8%, with accuracy ranging from 94.4% to 106.6%. Extraction yields varied from 14.6% to 78.7%, with matrix effects ranging from -15.9% to 13.3%. Freeze-thaw stability ranged from -6.1% to 11.5%, and 12-hour autosampler stability ranged from -10.4% to 9.8%. The method was applied to samples from 50 suicide attempt patients, with 28 samples showing quantifiable substances. Among these, benzoylecgonine (60.7%), diazepam (50%), and cocaine (17.8%) were the most frequently quantified compounds. Among these 50 patients, 9 also had samples collected with the Tasso+® capillary microsampling device, with the same substances being found with higher prevalence, of 75%, 50% and 37.5% respectively. Capillary plasma concentrations were similar to those of venous plasma. These results demonstrate the utility of the developed method for simultaneous quantification and identification of multiple analytes, showcasing suitable characteristics for emergency toxicology applications

Keywords: Automated solid phase extraction; HLB®; Liquid chromatography associated with mass spectrometry; Toxicological screening; Suicide attempt

Orientador: RAFAEL LINDEN

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/287557>

