

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Dissertações – 2022



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA TOXICIDADE DO MESILATO DE IMATINIBE E DUAS DE SUAS IMPUREZAS POR MEIO DE MODELOS ALTERNATIVOS

Autor: CASSIA FRANCKE ROSA DA SILVA ROCHA

Abreviatura: ROCHA, C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 24/02/2022

Resumo: O mesilato de imatinibe (MI) é um medicamento antitumoral de primeira escolha para o tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC), entretanto, impurezas e produtos de degradação podem estar presentes em formulações farmacêuticas. No entanto, poucos estudos estão disponíveis sobre a segurança dessas substâncias. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do MI e de duas de suas impurezas (Imp1 e Imp. 2) empregando modelos alternativos in vivo (*C.elegans* e Zebrafish) e in vitro (MTT, VN, SRB e Ames). A citotoxicidade do MI e suas impurezas foram semelhantes, porém as células Vero foram mais sensíveis no ensaio do vermelho neutro, sendo que as concentrações testadas para o MI foram de 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100 and 150 g/mL, enquanto para as impurezas a concentração máxima testada foi 100 g/mL. Nenhum efeito mutagênico foi evidenciado para MI e suas impurezas no teste de Ames nas concentrações testadas (10-500 g/placa para o MI e 5-250 g/placa para as impurezas). O ensaio com o modelo de *C. elegans* não evidenciou diferença significativa na letalidade ou desenvolvimento de nematoides para MI e Imp. 1, ambos testados nas concentrações de 15, 30, 62,5, 125, 250, 500 e 750 g/mL. A toxicidade de Imp. 1 foi maior que MI no ensaio de toxicidade aguda de embrião de Zebrafish ($p < 0,05$). Alterações subletais foram observadas quando os embriões foram tratados com Imp. 1 indicando o risco potencial de subprodutos de MI principalmente no modelo empregando embriões de peixe-zebra. As concentrações testadas para o ensaio de zebrafish foram de 50, 100, 150, 200, 250 g/mL para IM e 0,06, 0,12, 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 e 4,0 g/mL para a impureza 1. Considerando esses resultados, evidencia-se a importância de avaliar os efeitos toxicológicos usando diferentes modelos. O Zebrafish foi o modelo mais sensível para diferenciar a toxicidade entre MI e Imp. 1, denotando a importância do modelo para triagem toxicológica. Este trabalho fornece novas informações a respeito dos subprodutos do MI, que ainda precisam ser mais exploradas em relação a sua toxicidade. Objetivando esclarecer melhor os mecanismos de toxicidade das impurezas e prever níveis seguros de exposição humana, estudos adicionais são necessários.

Palavras-Chave: Imatinibe; impurezas; modelos alternativos; toxicidade.

Abstract: Imatinib mesylate (IM) is an antitumor drug of first choice for the treatment of chronic myeloid leukemia (LMC); however, impurities and degradation products may be present in pharmaceutical formulations. However, few studies are available on the safety of these substances. Thus, the objective of this work was to evaluate the toxicity of IM and two of its impurities (Imp1 and Imp. 2) using alternative models in vivo (*C.elegans* and Zebrafish) and in vitro (MTT, VN, SRB and Ames test). The cytotoxicity of IM and its impurities were similar, but Vero cells were more sensitive in the neutral red assay. The concentrations tested for IM were 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100 and 150 g/mL, while for the impurities the maximum concentration tested was 100 g/mL. No mutagenic effect was evidenced for IM and its impurities in the Ames test at the concentrations tested (10-500 g/plate for IM and 5-250 g/plate for impurities). The assay with the *C. elegans* model showed no significant difference in lethality or nematode development for IM and Imp. 1, both tested at concentrations of 15, 30, 62.5, 125, 250, 500 and 750 g/mL. The toxicity of Imp. 1 was greater than IM in the Zebrafish embryo acute toxicity assay ($p < 0.05$). Sublethal changes were observed when embryos were treated with Imp. 1 indicating the potential risk of IM by-products mainly in the model employing zebrafish embryos. The



concentrations tested for the zebrafish assay were 50, 100, 150, 200, 250 g/mL for IM and 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 and 4.0 g/mL for impurity 1. Considering these results, the importance of evaluating toxicological effects using different models is evident. Zebrafish was the most sensitive model to differentiate the toxicity between IM and Imp. 1, denoting the importance of the model for toxicological screening. This work provides new information about IM by-products, which still need to be further explored in relation to their toxicity. In order to better clarify the mechanisms of toxicity of impurities and predict safe levels of human exposure, additional studies are needed.

Keywords: Imatinib;impurities;alternative models;toxicity.

Orientador: SIMONE GASPARIN VERZA

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/283086>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA IN VIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS DE PIPER MIKANIANUM (KUNTH) STEUD

Autor: THALIA EMMANOELLA SEBULSQUI SARAIVA

Abreviatura: OLIVEIRA, TALITHA STELLA SANT'ANA

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 25/02/2022

Resumo: Piper mikanianum (Kunth) Steud é uma espécie, nativa do estado do Rio Grande do Sul, popularmente conhecida como Pariparoba, a qual é usada na forma de chá, para o tratamento de diversas doenças como infecções, diabetes, dores de dente e diarreia; entretanto, sua composição química ainda não é completamente conhecida, por haver poucos estudos com a espécie. Assim, o objetivo deste estudo foi preparar dois extratos aquosos a partir das folhas secas de P. mikanianum, um por infusão, simulando a forma mais utilizada pela população e um por maceração, a fim de comparar possíveis mudanças na estrutura dos metabólitos secundários, pela diferença entre as metodologias (temperatura, por exemplo), caracterizando os principais grupos de metabólitos secundários e, por fim, realizando a avaliação da toxicidade aguda para verificar a segurança dos extratos in vivo. Após a coleta, realizada na cidade de Santa Maria do Herval (RS), as folhas frescas foram secas em estufa de ar circulante e subsequentemente submetidas à moagem para obtenção do pó, o qual foi utilizado para triagem fitoquímica preliminar e preparação dos extratos aquosos por maceração e infusão. A toxicidade oral aguda foi avaliada em camundongos BalbC, os quais receberam uma única dose dos extratos, na concentração de 2000 mg/kg. Ao longo de 14 dias os animais foram acompanhados em relação a sinais de toxicidade, peso corporal e consumo alimentar. Através de ensaios clássicos de triagem fitoquímica, verificou-se a provável presença de alcaloides, compostos fenólicos, taninos e saponinas, bem como possível ausência de flavonoides e antraquinonas. Posteriormente, os extratos aquosos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos. A partir do cromatograma obtido, observou-se a presença de 8 compostos flavonoídicos, sugerindo a presença de flavonoides, classe de metabólitos comumente presente em outras espécies do gênero Piper. Entretanto não foram encontrados, na literatura revisada, espectros de UV correspondentes aos obtidos, sugerindo assim a presença de substâncias diferentes das descritas para o gênero. A porcentagem de flavonoides presentes nos extratos aquosos, infusão e maceração, de Piper mikanianum, foi padronizada em 0,06% 0,0003 de polifenóis totais e 0,02% 0,0009 de taninos totais, e 0,05% 0,001 de polifenóis totais e 0,015% 0,001 de taninos, respectivamente, sendo expressos como equivalente a pirogalol g/100g de extrato. Por outro lado, a espécie aqui estudada, apresentou ainda a provável presença de saponinas, o que, até o momento, não foi relatado para as demais espécies, tendo ainda que ser confirmada através de estudos por cromatografia líquida. Os extratos mostraram-se seguros quando avaliados de forma aguda in vivo, umavez que não desencadearam sinais de toxicidade, alterações no peso ou no consumo de ração, sugerindo a categoria 5 de segurança, conforme preconiza a normativa 423, da OECD (2001). A partir dos dados obtidos no presente trabalho e da possibilidade de estarmos diante de moléculas inéditas, bem como o amplo uso da espécie de forma popular e a carência de estudos acerca da espécie, a continuidade da caracterização dos extratos, e a avaliação da sua segurança e eficácia, é de grande importância.

Palavras-Chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Pariparoba; Triagem fitoquímica; Toxicidade in vivo



Abstract: *Piper mikanianum* (Kunth) Steud is a species native to the state of Rio Grande do Sul. It is commonly known as Pariparoba and consumed as tea to treat several diseases such as infections, diabetes, toothaches and diarrhea; however, its chemical composition is still not completely known due to the fact that few studies have been carried out with the species. Therefore, this study aimed to prepare two water extracts from dry leaves of *P. mikanianum*, one through infusion according to the most common use by the population, and one through maceration in order to compare possible changes in the structure of the secondary metabolites due to the different methods applied (temperature, for instance), characterize the main classes of secondary metabolites and assess the *in vivo* acute toxicity of the extracts. After the plant material was collected in the town of Santa Maria do Herval (RS), fresh leaves were dried in a hot air circulating oven then grinded to powder which was used for the preliminary phytochemical screening and for the preparation of water extracts through infusion and maceration. Acute oral toxicity was assessed in BalbC mice which received a single dose of 2000 mg/kg of the extracts. Toxicity signs, body weight and food intake were observed in the mice for fourteen days. Through phytochemical screening, the possible presence of alkaloids, phenolic compounds, saponins and tannins, as well as the possible absence of flavonoids and anthraquinones were observed. Then, the water extracts were assessed using a HighPerformance Liquid Chromatography (HPLC) with diode-array detection. The chromatogram obtained showed the presence of 8 flavonoid compounds which suggested the presence of flavonoids, a class of secondary metabolites commonly found in other species of the *Piper* genus. However, UV spectra obtained did not match others reported in the revised literature, suggesting the presence of uncharacterized substances to the genus. The amount of flavonoids in *Piper mikanianum* water extracts, both infusion and maceration, was 0.06 % 0.0003 of total polyphenols and 0.02% 0.0009 of total tannins, and 0.05% 0.001 of total polyphenols and 0.015% 0.001 of tannins, respectively. The results were expressed as mean standard deviation of gram (g) of pyrogalllic acid equivalent per 100 grams of the extract. On the other hand, the species presented the possible presence of saponins which has not been yet reported to other species of the genus and must be confirmed in studies with HPLC assessment. The water extracts proved to be safe when evaluated *in vivo* for their acute toxicity once they did not trigger signs of toxicity nor alterations in weight and food intake. This result suggests category 5 as recommended by OECD (2001), regulation 423. Due to the data obtained in the present study and the possibility of characterization of new molecules, as well as the wide use by the population and the lack of studies about the species, further assessments of the characterization of the extracts as well as the evaluation of their safety and efficacy are of great importance.

Keywords: High-Performance Liquid Chromatography;Papiroba;Phytochemical Screening;In vivo Toxicity

Orientador: ANDRESA HEEMANN BETTI

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/283102>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO TERAPÊUTICO DE PT-31 EM UM MODELO DE DEPRESSÃO ASSOCIADO À NEUROINFLAMAÇÃO

Autor: JULIANA MACHADO KAYSER

Abreviatura: KAYSER, J. M.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 28/06/2022

Resumo: A depressão é um transtorno do humor caracterizado pela apatia, baixa autoestima e retraimento social. Embora a depressão apresente alta prevalência global, a sua etiologia ainda não está plenamente esclarecida. Além disso, os antidepressivos disponíveis apresentam baixas taxas de remissão e estão comumente associados a efeitos adversos severos. Evidências crescentes demonstram que a neuroinflamação tem um papel chave na fisiopatologia da depressão. Assim, a atenuação da inflamação pode ser um alvo promissor para novas estratégias terapêuticas. PT-31 é um proposto agonista de receptores 2-adrenérgicos e que exerce efeito antinociceptivo em modelos animais de dor, sugerindo um efeito supressor da resposta inflamatória. Entretanto, o potencial efeito desta molécula na depressão em seu contexto neuroinflamatório ainda é desconhecido. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos terapêuticos de PT-31 através de ensaios comportamentais, bioquímicos e imunoenzimáticos em um modelo de depressão associado à neuroinflamação. Para tal, camundongos Swiss machos foram primeiramente expostos ao LPS (600 µg/kg, i.p.), exceto os animais pertencentes aos grupos naïve e per se. Decorridas 5 horas após a administração de LPS, os camundongos foram tratados por via oral conforme seus respectivos grupos experimentais: naïve (solução salina + 1% de Tween 80®), per se (PT-31 10 mg/kg), veículo (solução salina + 1% de Tween 80®), PT3 (PT-31 3 mg/kg), PT10 (PT-31 10 mg/kg), PT30 (PT-31 30 mg/kg) e FLU (fluoxetina 30 mg/kg). Todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) 6 horas após o LPS, e posteriormente submetidos ao TCA e ao teste de suspensão pela cauda (TSC) 24 horas após a administração de LPS. Depois, os animais foram eutanasiados (protocolo CEUA Unochapecó 018/CEUA/2020 e CEUA Universidade Feevale nº 02.21.095) e realizou-se a dissecação dos encéfalos para ensaios bioquímicos e imunoenzimáticos. Conforme esperado, o grupo veículo demonstrou redução significativa da atividade locomotora ($p < 0,0001$) 6 horas após a administração do LPS, o que foi revertido por PT3 ($p = 0,0089$) neste momento de avaliação. No TSC, o LPS induziu um aumento no tempo de imobilidade dos animais do grupo veículo ($p = 0,0001$), representando o comportamento do tipo deprimido. Entretanto, PT3, PT10 e PT30 atenuaram o aumento no tempo de imobilidade induzido por LPS ($p < 0,0001$). Com relação às análises bioquímicas, todas as doses testadas de PT-31 atenuaram o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido por LPS ($p < 0,0001$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para ambos os parâmetros de estresse oxidativo avaliados: substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tiois não proteicos (NPSH). Quanto aos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o grupo veículo demonstrou uma redução em relação ao grupo naïve ($p = 0,0348$), e isso não foi significativamente melhorado por PT-31 ($p > 0,05$). Em conjunto, estes resultados fornecem evidências de um efeito antidepressivo de PT-31, sugerindo uma possível ação anti-inflamatória neste modelo animal de depressão. Portanto, PT-31 torna-se uma molécula promissora a ser investigada para o tratamento da depressão associada à neuroinflamação.

Palavras-Chave: Hidantoínas; Lipopolissacarídeo; Mieloperoxidase; Teste de suspensão pela cauda; Teste do campo aberto

Abstract: Depression is a mood disorder characterized by apathy, low self-esteem, and social withdrawal. Although depression has a high global prevalence, its etiology is still not fully understood. In addition, available antidepressants have low remission rates and are commonly associated with severe adverse effects. Growing evidence demonstrate



that neuroinflammation plays a key role in the pathophysiology of depression. Thus, the attenuation of inflammation may be a promising target for novel therapeutic strategies. PT-31 is a putative 2-adrenoceptor agonist that exerts antinociceptive effect in animal models of pain, suggesting a suppressive effect on the inflammatory response. However, the putative effect of this molecule on depression in its neuroinflammatory context is still unknown. The aim of this study was to evaluate therapeutic effects of PT-31 through behavioral, biochemical, and immunoenzymatic assays in a model of inflammation-induced depression. For this purpose, male Swiss mice ($n = 84$) were firstly exposed to LPS ($600 \mu\text{g/kg}$, i.p.), except the animals belonging to naïve and per se groups. After 5 hours from LPS administration, mice were treated orally according to their respective experimental groups: naïve (saline + 1% Tween 80®), per se (PT-31 10 mg/kg), vehicle (saline + 1% Tween 80®), PT3 (PT31 3 mg/kg), PT10 (PT-31 10 mg/kg), PT30 (PT-31 30 mg/kg) and FLU (fluoxetine 30 mg/kg). All animals were subjected to the open field test 6 hours after LPS, and later subjected to OFT and tail suspension test (TSC) 24 hours after LPS administration. Afterwards, animals were euthanized (CEUA Unochapecó protocol #018/CEUA/2020 and CEUA Feevale University protocol #02.21.095) and brains were dissected for biochemical analyses. As expected, the vehicle group demonstrated a significant reduction in the locomotor activity ($p < 0.0001$) 6 hours after LPS administration, which was reverted by PT3 ($p = 0.0089$) at this time of evaluation. In the TST, LPS induced an increase in the immobility time of animals from the vehicle group ($p = 0.0001$), representing the depressive-like behavior. In contrast, PT3, PT10 and PT30 reversed the LPS-induced increase in immobility time ($p < 0.0001$). Regarding the biochemical analysis, all tested doses of PT-31 attenuated the increase in myeloperoxidase (MPO) activity induced by LPS ($p < 0.0001$). However, no significant differences ($p > 0.05$) were observed for both evaluated oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and non-protein thiols (NPSH). Regarding the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels, the vehicle group demonstrated a reduction compared to the naïve group ($p = 0.0348$), and this was not significantly improved by PT-31 ($p > 0.05$). Taken together, these results provide evidence for an antidepressant effect of PT-31, suggesting a possible anti-inflammatory action in this animal model of depression. Therefore, PT-31 becomes a promising molecule to be investigated for the treatment of inflammation-associated depression.

Keywords: Hydantoins; Lipopolysaccharide; Myeloperoxidase; Open field test; Tail suspension test

Orientador: ANDRESA HEEMANN BETTI

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284111>



Trabalho de Conclusão

Título: DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ETANOL EM AMOSTRAS DE SANGUE SECO (DBS) NA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE USO DE ÁLCOOL EM MOTORISTAS PROFISSIONAIS E SUA RELAÇÃO COM ANSIEDADE, DEPRESSÃO E ESTRESSE

Autor: ANDIARA DO CARMO ARTMANN

Abreviatura: ARTMANN, A.C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 24/02/2022

Resumo: O consumo nocivo de álcool é um dos principais fatores de risco para o surgimento de diversas doenças, estando associado a alterações psicológicas e cognitivas, e em ocorrências de diversas patologias, necessitando um olhar especial voltado a essa prática e ao risco que esse comportamento pode ocasionar. O fosfatidiletanol (Peth) é um marcador direto do uso de etanol com a janela de detecção de até 4 semanas, ainda etil glicuronídeo (EtG) e etil sulfato (EtS) são indicadores de uso recente de álcool com a janela de detecção de cerca de 8 horas. Os motoristas de transporte de cargas e passageiros podem estar vulneráveis ao consumo de álcool e outras substâncias psicoativas como válvula de escape para situações estressantes, jornadas de trabalhos exaustivas e insalubres, pressão e estresse no trânsito. Mostra-se útil a dosagem de marcadores específicos para avaliar a exposição crônica e recente ao álcool, empregando uma fácil e prática coleta utilizando amostras de sangue seco em papel (DBS). O objetivo foi avaliar o perfil de consumo de álcool de motoristas profissionais através de metabólitos em amostras de DBS e sua relação com o AUDIT-C para avaliar consumo nocivo de álcool e a escala de ansiedade, depressão e stress (DASS). Participaram do estudo 97 voluntários, sendo a maioria motorista de veículos de carga (73%), homens (95,7%) e com a idade média de 45 anos. Os escores no AUDIT-C foram de 0 a 10, onde 30,9% nível de consumo moderado e 11,3% classificados com consumo de alto risco. A maior parte com níveis normais para estresse (81,4%), ansiedade (83,%) e depressão (86,6%). Total de 86 motoristas apresentaram níveis quantificáveis de Peth, variando entre 2,0 e 955,4 ng/mL. Quatorze motoristas tiveram níveis detectáveis de EtG, entre 0,04 e 1,51 ug/mL, já o EtS foi detectado em oito motoristas, entre 0,02 e 0,35 ug/mL. Verificou-se uma correlação significativa entre os níveis de Peth e o questionário AUDIT-C. A partir dos resultados, na população estudada não evidenciou-se a associação entre o hábito de consumo de álcool e os sintomas de estresse, ansiedade e depressão. Esses marcadores demonstraram ser importantes para monitorar o uso regular do álcool nessa população, e ainda constatou-se que grande parte possui longa jornada de trabalho. Trata-se ainda a primeira pesquisa a avaliar marcadores de uso de álcool em motoristas profissionais e a associação com estresse, ansiedade e depressão.

Palavras-Chave: Fosfatidiletanol; Etil Glicuronídeo; Etil Sulfato; Álcool; Motoristas

Abstract: Harmful consumption of alcohol is one of the main risk factors for the emergence of various diseases, remain associated with psychological and cognitive changes, needing a special look at this practice and the risk that this behavior can cause. Peth is a direct marker of ethanol use with a detection window of up to 4 weeks, yet EtG and EtS are indicators of recent alcohol use with a detection window of about 8 hours. Professional drivers are highly exposed to work-related stress factors, as work shift schedule, irregular meal times, long driving hours, constant visual and mental alertness, traffic congestion, bad road and weather conditions. These professionals are more susceptible to stress, anxiety and depression, which may lead to several health disorders, as well as negatively impact on family relations and quality of life. Hence, alcohol and psychoactive substances intake are often used as outlet for these disorders. The estimation of consumption of ethanol and risk was evaluated by measuring the direct biomarkers Peth, EtG and EtS in DBS samples and through the self-report AUDIT-C. The sample consisted mostly of males (98%), married (56%),



Caucasian (98%), with a high school degree (42%) and a family income between 2 - 3 national minimum wages (65%). The majority of the volunteers were truck drivers (75.3%) with employment relationship (90.7%). Almost half of the participants (43.3%) informed daily workload of more than 10 hours and 53% travel long distances. The majority of the volunteers were classified as average levels for stress (81.4%), anxiety (83%), and depression (86.6%). AUDIT-C scores varied from 0 to 10. According to the self-report questionnaire, 30.9% were classified as moderate risk and 11.3% as high risk for alcohol drinking behavior. There was a moderate correlation ($r_s = 0.45$, $p = <0.01$) between Peth levels and AUDIT-C score as continuous variables. The ROC curve of 0.768 with a Peth cut-point of 59.0 ng/ml showed 78% sensitivity and 73% specificity to discriminate for high alcohol intake risk. 34% had Peth concentrations 59,0 ng/mL which was not significantly associated with the presence of any level of stress, anxiety and depression in Fisher exact test. Evidencing a relevant number of drivers with regular alcohol intake, high workload, and poor frequency of physical activities and high presence of chronic diseases. We found no significant association between alcohol consumption and stress, depression and anxiety. Our findings indicate a moderate correlation between Peth levels and the AUDIT-C score, which reflects the biomarker importance.

Keywords: Phosphatidylethanol; Ethyl glucuronide; Ethyl sulphate; Dried blood spots (DBS); Professional drivers

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Disponível em acervo: <http://pergamum.feevale.br/acervo/283014>



Trabalho de Conclusão

Título: EMPREGO DA MICROAMOSTRAGEM DE SANGUE SECO NO MONITORAMENTO DA TERAPIA COM MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Autor: MARIA EDUARDA KRUTZMANN

Abreviatura: KRUTZMANN, M. E.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2022

Resumo: A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica, caracterizada como uma doença proliferativa do sistema hematopoiético. Mesilato de imatinibe (IM), inibidor seletivo da tirosina quinase, é considerado terapia de primeira linha para LMC, indicado a pacientes adultos e pediátricos com cromossomo Philadelphia (Ph+). Contudo, pacientes em tratamento com IM podem apresentar diferentes respostas devido a variabilidade interindividual. O monitoramento terapêutico ao tratamento deve ser rotineiramente realizado para a identificação de perfil de resposta ao tratamento, adesão, ou possível interação medicamentosa, auxiliando assim a conduta médica a ser aplicada. Microamostras de sangue seco (VAMS) são uma alternativa inovadora de coleta cujas vantagens incluem a possibilidade de coleta domiciliar pelo próprio paciente ou no consultório médico, com pouco volume de sangue e não necessita de refrigeração, facilitando o transporte. O IM e seu metabólito norimatinibe (NIM) em VAMS foram dosados empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas em sequencial (LC-MS/MS). Os parâmetros de validação foram adequados (linearidade, precisão e exatidão). Os analitos mantiveram-se estáveis no período de 14 dias em amostras de VAMS mantidas a 25 e 45°C. Em amostras de sangue seco um dos pontos que deve ser considerado é o efeito do HCT na exatidão e rendimento da extração do ensaio, os quais não tiveram impacto significativo. A metodologia desenvolvida neste estudo se mostrou satisfatória para a determinação de IM e NIM em amostras volumétricas de sangue seco e foi utilizada no monitoramento de pacientes com LMC. Foram inclusos 33 pacientes, com idade média de 52 anos, onde 84,8% ingeriam doses de 400 mg/dia e a maioria era do sexo masculino (69,7%). O ensaio foi totalmente validado de acordo com as diretrizes de validação bioanalítica. As concentrações plasmáticas estimadas de IM não foram estatisticamente diferentes entre grupos de acordo com a aderência ($p=0,15$), com mediana de 789 ng ml⁻¹ no grupo com algum nível de não aderência versus 1141,9 ng ml⁻¹ no grupo com aderência, classificado com o questionário Morisky Green. A metodologia desenvolvida neste estudo foi satisfatória para a determinação de IM e NIM no VAMS e pode ser utilizada em rotinas hospitalares e de consultório para o acompanhamento terapêutico de pacientes com LMC.

Palavras-Chave: Mesilato de imatinibe; norimatinibe; adesão; VAMS; leucemia mielóide crônica

Abstract: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a hematologic neoplasm, characterized as a proliferative disease of the hematopoietic system. Imatinib mesylate (IM), a selective tyrosine kinase inhibitor, is considered first-line therapy for CML, indicated for adult and pediatric patients with Philadelphia chromosome (Ph+). However, patients on treatment with IM may show different responses due to interindividual variability. Therapeutic monitoring to treatment should be routinely performed to identify treatment response profile, compliance, or possible drug interaction, thus assisting the medical management to be applied. Dried blood micro-samples (VAMS) are an innovative collection alternative whose advantages include the possibility of collection at home by the patient or at the doctor's office, with a small volume of blood and does not require refrigeration, facilitating transport. IM and its metabolite norimatinib (NIM) in VAMS were dosed employing high-performance liquid chromatography coupled with sequencing mass spectrometry (LC-MS/MS). Validation parameters were adequate (linearity, precision and accuracy). The analytes remained stable over the 14-day period in VAMS samples kept at 25 and 45°C. In dried blood samples one of the points that should be considered is the



effect of HCT on the accuracy and extraction yield of the assay, which had no significant impact. The methodology developed in this study proved satisfactory for the determination of IM and NIM in dry blood volumetric samples and was used in the monitoring of patients with CML. The mean age of the patients was 52 years, 84.8% ingested doses of 400 mg/day, and the majority were male (69.7%). The assay was fully validated according to bioanalytical validation guidelines. Estimated plasma concentrations of IM were not statistically different between groups according to adherence ($p=0.15$), with a median of 789 ng ml⁻¹ in the group with some level of non-adherence versus 1141.9 ng ml⁻¹ in the group with adherence, classified with the Morisky-Green questionnaire. The methodology developed in this study was satisfactory for the determination of IM and NIM in VAMS and can be used in hospital and routines for the therapeutic follow-up of patients with CML.

Keywords: Imatinib mesylate; norimatinib; adherence; VAMS; chronic myeloid leukemia.

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284211>



Trabalho de Conclusão

Título: ESTRATÉGIAS DE MICROAMOSTRAGEM APLICADAS À DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES ENDÓGENAS DE URACIL COMO FERRAMENTA PARA PREDIÇÃO DE TOXICIDADE ÀS FLUOROPYRIMIDINAS

Autor: MILENE MENESTRINA DEWES

Abreviatura: DEWES, M. M.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2022

Resumo: As fluoropirimidinas (FP) são uma classe de fármacos que inclui o 5-fluoruracil (5-FU) e os pró-fármacos inativos capecitabina e o tegafur e que são ativados quando metabolizados a 5-FU. São amplamente utilizadas para o tratamento de diversos tipos de cânceres. Até 30% dos pacientes tratados com esses medicamentos apresentam toxicidade grave e para cerca de 1% dos pacientes, a toxicidade é fatal. A principal causa de toxicidade é relacionada a deficiências na principal enzima envolvida no catabolismo do 5-FU, a dihidropirimidina desidrogenase (DPD), endogenamente responsável pelo metabolismo da base pirimidina uracil (U). A dosagem de U é uma abordagem bastante utilizada a fim de se avaliar a atividade da DPD, porém no Brasil, essas análises não são comumente realizadas. São ensaios complexos, restritos a laboratórios de referência e questões logísticas dificultam o acesso aos testes. Neste contexto, nossa pesquisa envolveu o desenvolvimento e a validação de um ensaio por LC-MS/MS para a quantificação U em amostras de plasma seco em papel – dried plasma spots (DPS). Devido à presença endógena de U no plasma e para avaliar as interações potencialmente complexas entre o plasma e a matriz de papel usada no DPS, uracil-13C15N2 (U-13C15N2) marcado isotopicamente foi usado como analito substituto no desenvolvimento e validação do método. Ainda, com o desenvolvimento de vários novos dispositivos que visam maior comodidade ao paciente na coleta de amostras de sangue que podem contribuir com uma maior adesão à realização de ensaios como a quantificação de U, foi desenvolvido e validado um ensaio de por LC-MS/MS para quantificação de U em microamostras de soro obtidas com o dispositivo Tasso-SST®. Os resultados dos parâmetros dos métodos validados ficaram dentro dos limites estabelecidos pelos guias internacionais de validação de métodos bionalíticos. As medidas de U obtidas com a metodologia validada para microamostras de soro obtidas com o dispositivo Tasso-SST® foram altamente correlacionadas àquelas obtidas pela matriz convencional (plasma líquido) e, portanto, a micro amostragem utilizando o dispositivo pode ser utilizada alternativamente ao plasma líquido para a quantificação de U. Para as amostras em DPS, os resultados das medidas obtidas mostraram baixa correlação com aquelas obtidas com o plasma líquido, indicando que as medidas não são equivalentes entre as duas matrizes. Outros estudos são necessários com o objetivo de viabilizar a utilização de DPS nas análises de quantificação de U.

Palavras-Chave: Uracil; DPS, Tasso-SST®, LC-MS/MS, micro amostragem.

Abstract: Fluoropyrimidines (FP) are drugs that include 5-fluorouracil (5-FU) and the inactive prodrugs capecitabine and tegafur and that are activated when metabolized to 5-FU. They are widely used in clinical practice different types of cancer. Up to 30% of the patients treated with these drugs experience severe toxicity, and for about 1% of patients, toxicity is fatal. The main cause of toxicity is related to deficiencies in the main enzyme metabolizing 5-FU, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), which is endogenously responsible for the metabolism of the pyrimidine base uracil (U). Plasma U levels are currently the most suitable methods to identify patients with DPD deficiency, but in Brazil, these analyzes are not commonly performed. These analyses are complex, restricted to reference laboratories and logistical issues make access to the tests difficult. In this context, the research involved the development and validation of an LC-MS/MS assay for the quantification of U concentrations in dried plasma samples (DPS). Due to the endogenous presence of U in plasma and to evaluate the potentially complex interactions between the plasma and the paper matrix used in DPS, an isotopically labeled uracil-13C15N2 (U-13C15N2) was used as a surrogate analyte in the development



and validation of the assay. Also, considering the development of several new devices that aim at greater convenience for the patient in sampling and, consequently, that can contribute to a greater patient's adherence in blood analyses such as U measurement, a LC-MS/MS assay was developed and validated for U quantification in serum microsamples obtained with the Tasso-SST® device. The parameter results of these validated methods were according to the limits established by the international guidelines for the validation of bioanalytical methods. The U measurements obtained with the validated methodology for U quantification in serum microsamples obtained with the Tasso-SST® device were highly correlated with those obtained by the conventional matrix (liquid plasma) and therefore micro sampling using the device can be used alternatively to liquid plasma for the quantification of U. For DPS, the results of the measurements obtained showed a low correlation with those obtained with the liquid plasma, indicating that the measurements are not equivalent between the two matrices. Other studies are needed to enable the use of DPS in U quantification analyses.

Keywords: Uracil; DPS, Tasso-SST®, LC-MS/MS, capillary micro sampling.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284363>



Trabalho de Conclusão

Título: MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE EUGENIA UNIFLORA L. POR SPRAY-DRYING: OTIMIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA

Autor: NATALIA DALANHOL DE QUADROS

Abreviatura: QUADROS, N. D.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 23/02/2022

Resumo: A *Eugenia uniflora*, espécie nativa do Brasil, é pertencente à família Myrtaceae, popularmente denominada Pitangueira e em função dos usos etnofarmacológicos relatados, despertou interesse do SUS. A monografia disponível prevê mais de 40 indicações terapêuticas, dentre elas o tratamento de distúrbios do sistema digestivo, tais como diarreia e cólicas abdominais. Estudos inferem que esta propriedade está relacionada com os princípios ativos presentes na espécie, como os taninos e flavonoides. Assim, esse trabalho teve por objetivo obter um produto tecnológico a partir de *E. uniflora*, quimicamente caracterizado, e avaliar a toxicidade do produto obtido, bem como sua atividade farmacológica. Para tanto, o teor de taninos totais foi determinado por espectrofotometria e o teor de flavonoides, por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD) através de método desenvolvido e validado. A otimização dos extratos vegetais foi proposta a partir de um desenho experimental de BoxBehnken, sendo a solução ótima de extração constituída por acetona:água como solvente 60:40 (v/v) com temperatura de 60°C e agitação constante. A solução foi submetida a secagem em Spray-drying, obtendo-se um pó fino, levemente amarelado, cuja análise por Microscopia Eletrônica de Varredura demonstra morfologia arredondada, com tamanhos de partícula entre 1,5 e 15 µm. O extrato seco apresentou teor de miricitrina, flavonoide majoritário, de 0,58 g% ($\pm 2,34$ %) e teor de flavonoides totais de 1,02 g% ($\pm 2,94$ %). Através do ensaio de citotoxicidade obteve-se CC50 de 1672 µg/mL para o ensaio de MTT e 675 µg/mL para o vermelho neutro, ambos em 96 horas. O estudo de toxicidade aguda se deu em camundongos Balb-C e nenhum dos sinais de toxicidade preconizados pela normativa da OECD 423 foi observado quando administrado extrato na dose de 2000 mg/kg. A atividade farmacológica foi comprovada, em estudo in vivo, demonstrando eficácia na prevenção dos eventos diarreicos induzidos por óleo de rícino, sugerindo um efeito dose-dependente do extrato. Neste sentido, o extrato seco obtido demonstra ser uma alternativa promissora para a produção de um medicamento fitoterápico com atividade antidiarreica à base de *E. uniflora*.

Palavras-Chave: Atividade antidiarreica; *Eugenia uniflora*; Medicamento fitoterápico.; Toxicidade

Abstract: *Eugenia uniflora*, a species native to Brazil, belongs to the Myrtaceae family, popularly called Pitangueira. Due to the reported ethnopharmacological uses, it aroused the interest of the SUS. The available monograph provides more than 40 therapeutic indications, among them the treatment of disorders of the digestive system, such as diarrhea and abdominal cramps. Studies infer that this property is related to the active principles present in the species, such as tannins and flavonoids. Thus, this work aimed to obtain a technological product from *E. uniflora*, chemically characterized, and to evaluate the toxicity of the product obtained, as well as its pharmacological activity. Therefore, the total tannin content was determined by spectrophotometry and the flavonoid content was determined by high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) using a developed and validated method. The optimization of plant extracts was proposed based on a Box-Behnken experimental design, and the optimal extraction solution consisted of acetone:water as solvent 60:40 (v/v) with a temperature of 60°C and constant agitation. The solution was subjected to spray-drying, obtaining a fine, slightly yellowish powder, whose analysis by Scanning



Electron Microscopy shows rounded morphology, with particle sizes between 1.5 and 15 μm . The dry extract showed 0.58 g% ($\pm 2.34\%$) of myricitrin, the major flavonoid, and 1.02 g% of total flavonoids ($\pm 2.94\%$). The cytotoxicity study showed a CC50 of 1672 $\mu\text{g/mL}$ for the MTT assay and 675 $\mu\text{g/mL}$ for the neutral red, both at 96 hours. The acute toxicity study was carried out in Balb-C mice and none of the signs of toxicity recommended by the OECD 423 regulations were observed when the extract was administered at a dose of 2000 mg/kg. The pharmacological activity was confirmed in an in vivo study, demonstrating efficacy in the prevention of diarrheal events induced by castor oil, suggesting a dose-dependent effect of the extract. In this sense, the obtained dry extract proves to be a promising alternative to produce an herbal medicine with antidiarrheal activity based on *E. uniflora*.

Keywords: Antidiarrheal activity.; *E. uniflora*; Herbal medicine; Toxicity

Orientador: SIMONE GASPARIN VERZA

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/283017>



Trabalho de Conclusão

Título: NANOCÁPSULAS CONTENDO CLORIDRATO DE DULOXETINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM MODELO ALTERNATIVO CAENORHABDITIS ELEGANS

Autor: CAROLINA GRAVE

Abreviatura: GRAVE, C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2022

Resumo: A nanotecnologia vem sendo uma área muito investigada por pesquisadores e de interesse da indústria farmacêutica, já que estas nanoestruturas possuem a habilidade de atravessar barreiras que limitam a eficácia dos medicamentos convencionais. O cloridrato de duloxetine (DLX) é um fármaco utilizado para o tratamento do transtorno depressivo maior, fibromialgia e outras patologias, porém possui reduzida biodisponibilidade e uma variedade de efeitos adversos. Assim, este fármaco apresenta-se como candidato a ser veiculado em sistemas nanoestruturados, visando diminuir os efeitos tóxicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas de poli(-caprolactona), com e sem fármaco, e avaliar a toxicidade em modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*. A fim de quantificar o fármaco em nanocápsulas, foi desenvolvido e validado um método analítico, por CLAE-UV. As nanocápsulas foram produzidas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação. Foi realizado estudo de degradação bem como determinação do modelo de cinética de degradação do fármaco. Posteriormente, foi realizada a avaliação toxicológica em modelo alternativo *Caenorhabditis elegans* e avaliados quanto a determinação da dose letal 50%, desenvolvimento e reprodução. Inicialmente foram obtidas nanocápsulas sem fármaco contendo diferentes óleos que apresentaram características físico químicas satisfatórias e estabilidade pelo período de 60 dias. Porém, somente a nanocápsula contendo triglicerídeo de cadeia média não apresentou toxicidade na concentração de 25 µg.mL⁻¹ em relação ao controle. Já para as nanocápsulas com a mistura de óleos houve uma diferença significativa quando comparadas ao controle na concentração de 10 µg.mL⁻¹. A partir dos estudos de toxicidade, a nanocápsula contendo como núcleo triglicerídeo de cadeia média (NCT) foi selecionada para veiculação do fármaco (NCT DLX) e posteriores estudos de estabilidade, degradação forçada e avaliação da toxicidade no *C. elegans*. O método analítico por HPLC-UV desenvolvido apresentou-se seletivo, linear, preciso e exato. As nanocápsulas contendo DLX apresentaram características físico-químicas e tecnológicas satisfatórias e estabilidade durante 60 dias. Os resultados do estudo de degradação indicaram maior proteção do fármaco a partir de nanocápsulas frente à fotodegradação, uma vez que o polímero conseguiu manter relativa proteção do fármaco por 420 minutos, mas frente às condições de degradação ácida analisadas não promoveu proteção comparada ao controle. A avaliação da toxicidade em modelo alternativo *C. elegans* mostrou que a NCT DLX apresentou diferença significativa no desenvolvimento dos nematoides a partir da concentração de 50 µg.mL⁻¹. Quanto a análise da DL 50%, a nanocápsula contendo o fármaco apresentou menor toxicidade na sobrevivência quando comparado ao fármaco livre (DLX livre). Na análise da reprodução, o DLX livre apresentou diferença significativa ao controle na concentração 10 µg.mL⁻¹, enquanto que a NCT DLX apresentou diferença significativa ao controle apenas na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Com os resultados encontrados até então, mais estudos devem ser realizados a fim de investigar e avaliar os efeitos adversos promovidos pelo DLX, além de comparar o DLX livre a NCT DLX na entrega do fármaco aos receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos. Porém podemos concluir que a NCT DLX mostrou ser menos tóxica no modelo alternativo *C. elegans* quando comparada ao DLX livre.

Palavras-Chave: cloridrato de duloxetine; nanocápsulas; toxicidade; *Caenorhabditis elegans*



Abstract: Nanotechnology has been an area of interest by researchers and the pharmaceutical industry, as nanostructures can cross the barriers that limit the effectiveness of conventional drugs. Duloxetine hydrochloride (DLX) is a drug used to treat major depressive disorder, fibromyalgia and other pathologies, even though it presents reduced bioavailability and several adverse effects. DLX is, therefore, a candidate drug to be delivered in nanostructured systems, aiming to optimize its pharmacological activity. In this context, this work aimed to develop and characterize poly(-caprolactone) nanocapsules, with and without drug, and to evaluate their toxicity in the alternative model *Caenorhabditis elegans*. An analytical method using HPLC-UV was developed and validated to quantify the drug in the nanocapsules. The nanocapsules were obtained using nanoprecipitation and characterized based on particle size, polydispersity index, zeta potential, pH, drug content, and encapsulation efficiency. A degradation study was performed and the degradation kinetics model was determined. Subsequently, a toxicological assessment was performed in *Caenorhabditis elegans*, comprising the determination of the lethal dose 50, and the evaluation of nematode development and reproduction. Initially, blank nanocapsules were prepared to contain different oils, with satisfactory physicochemical characteristics and stability for 60 days. However, only the nanocapsules containing medium chain triglyceride showed no toxicity at the concentration of 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ compared to control. As for the nanocapsules with the mixture of oils, there was a significant difference at the concentration of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ compared to control. Based on the toxicity studies, the nanocapsule containing medium-chain triglyceride (NCT) was selected for drug delivery (NCT DLX) and further stability, forced degradation and toxicity studies in *C. elegans*. The HPLC-UV analytical method developed was selective, linear, precise and exact. The nanocapsules containing DLX presented satisfactory physicochemical and technological properties, and stability for 60 days. The results of the degradation study of the nanoencapsulated drug indicated protection against photodegradation, as the polymer maintained relative drug stability for 420 minutes. In acid degradation conditions, however, it did not provide protection compared to control. The toxicity assessment in the alternative model *C. elegans* showed that NCT DLX caused a significant impact on nematode development above the concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As for the analysis of the LD 50, the drug-loaded nanocapsule presented a lower effect on survival when compared to the free drug. In the reproduction assessment, free DLX presented a significant difference compared to control at the concentration of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, whereas NCTDLX presented a significant difference compared to control only at the concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Based on the current results, further studies should be carried out to investigate and evaluate the adverse effects of DLX, and to compare free DLX with NCT DLX in terms of drug delivery to noradrenergic and serotonergic receptors. Still, it is possible to conclude that NCT DLX presented lower toxicity in the alternative model *C. elegans* when compared to free DLX.

Keywords: duloxetine hydrochloride; nanocapsules; toxicity; *Caenorhabditis elegans*

Orientador: CRISTIANE BASTOS DE MATTOS

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284395>



Trabalho de Conclusão

Título: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE ACACIA MEARNsii DE WILD INCORPORADO AO XAMPU A 2.5% E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRELIMINAR IN VITRO

Autor: ELEN LUIZA PELISOLI FORMAGIO ABDALLA

Abreviatura: FORMAGIO, E. L. P.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2022

Resumo: A utilização de ingredientes naturais e/ou orgânicos em formulações cosméticas é uma tendência crescente no mercado mundial. O uso de compostos/ fitocomplexos vegetais que demonstrem benefícios cosméticos têm sido amplamente explorado. Paralelamente, a busca de recursos renováveis vem sendo priorizada, no intuito de reduzir o impacto da crise ambiental mundial. A espécie *A. mearnsii* De Wild (acácia negra) é uma árvore de grande importância econômica no Rio Grande do Sul, usada como matéria-prima para a obtenção de carvão, cujas partes aéreas são geralmente descartadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi incorporar extrato hidroalcoólico das folhas de *Acacia mearnsii* (EHA) ao xampu base a 2,5% (p/p). O EHA foi obtido a partir das folhas maceradas, em temperatura ambiente, até o esgotamento do material vegetal. Posteriormente, foi concentrado em evaporador rotatório, sob temperatura de 40°C e, em seguida liofilizado o qual teve rendimento de 28,4%. Realizou-se caracterização fitoquímica do EHA e investigou-se seu potencial efeito antioxidante. O estudo de estabilidade e segurança preliminar da formulação foi realizado através de testes in vitro, o qual seguiu as recomendações do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos do Brasil. A análise fitoquímica do EHA caracterizou principalmente a presença de compostos fenólicos, o qual apresentou teor de $708,67 \pm 14,6$ mg equivalentes de ácido gálico/ g de compostos fenólicos e de flavonóides, em quantidade de $47,525 \pm 1,27$ mg equivalentes de catequina/ g. Avaliou-se a capacidade antioxidante do EHA frente aos métodos de estabilização do radical ABTS•+ (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), captura do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e de redução do ferro (Fe³⁺), observando-se considerável efeito antioxidante. Em relação à formulação do EHA incorporado ao xampu, esta manteve-se estável durante os 90 dias de observação frente aos testes de centrifugação, parâmetros organolépticos, colorimetria, determinação de pH, e avaliação de formação e manutenção de espuma. Quanto à avaliação de segurança preliminar, realizou-se o ensaio HET-CAM (Hen's egg chorioallantoic membrane) e a avaliação da citotoxicidade in vitro pelo ensaio de sulforrodamina B, utilizando queratinócitos humanos da linhagem HaCaT. Todos os testes foram conduzidos paralelamente com o xampu base (livre de parabenos) sem o EHA incorporado. Através das análises verificou-se que a incorporação do EHA ao xampu base foi compatível, cujos resultados físicos e físico-químicos encontraram-se dentro dos parâmetros préestabelecidos pelas recomendações do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos do Brasil. Quanto ao ensaio de segurança preliminar, através do ensaio HET-CAM o EHA não promoveu efeito irritante. Quanto ao ensaio de citotoxicidade frente aos queratinócitos, o EHA apresentou viabilidade celular acima de 70%. Em ambos os ensaios e incorporação do EHA ao xampu não promoveu citotoxicidade adicional à formulação. Desta forma, os resultados obtidos neste presente trabalho indicam que a incorporação do EHA a 2,5% ao xampu base é estável e segura. Os compostos fenólicos presentes no EHA permitiram considerável efeito antioxidante, os quais podem ser benéficos à melhora da condição dermatológica do couro cabeludo. Este estudo constitui uma importante bioprospecção econômica e ambiental, sugerindo uma alternativa interessante para uma destinação nobre das partes aéreas da *A. mearnsii*, as quais são geralmente descartadas.

Palavras-Chave: *Acacia mearnsii*; xampu; citotoxicidade; cultura celular; teste de segurança; cosméticos

Abstract: The application of natural and/or organic ingredients in cosmetic formulations is a growing trend in the world market. The use of plant compounds/ phytocomplexes that demonstrate cosmetic benefits has been widely explored. At



the same time, the search for renewable resources has been prioritized in order to reduce the impact of the global environmental crisis. The species *A. mearnsii* De Wild (black wattle) is a tree of great economic importance in the state of Rio Grande do Sul, used as raw material to obtain charcoal, which aerial parts are usually discarded. This way, the objective of this study was to incorporate hydroalcoholic extract of *Acacia mearnsii* leaves (HEA) into a shampoo base at 2.5% (w/w). HEA was obtained from leaves that were macerated at room temperature until plant material was exhausted. Subsequently, it was concentrated via rotary evaporator at a temperature of 40°C and then lyophilized, resulting a yield of 28.4%. The phytochemical characterization of HEA was performed and its potential antioxidant ability was investigated. The preliminary stability and safety study of the formulation was performed through in vitro tests, which followed the recommendations of the Brazilian Guidelines of Quality Control in Cosmetics. The phytochemical analysis of HEA identified mainly the presence of phenolic compounds, which showed a content of 708.67 ± 14.6 mg gallic acid equivalents/g of phenolic compounds and 47.525 ± 1.27 mg CATE/ g of flavonoids. HEA antioxidant ability was evaluated with ABTS•+ (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), radical cation, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and the ferric reducing capacity (Fe³⁺) methods, where it was possible to observe a considerable antioxidant power. Regarding the shampoo formulation incorporated with HEA, it remained stable during the 90 days of observation going through centrifugation tests, organoleptic parameters evaluation, colorimetry, pH determination, and evaluation of foam formation and maintenance. For the preliminary safety assessment, HET-CAM (Hen's egg test on chorioallantoic membrane) assay was performed and the in vitro cytotoxicity assessment was carried out by the sulforhodamine B assay, using human keratinocytes of the HaCaT lineage. All tests were also conducted in parallel with the shampoo base (paraben-free) without HEA incorporation. With these analyzes, it was verified that the incorporation of HEA into the shampoo base was compatible, as physical and physical-chemical results were within the parameters pre-established by the recommendations of the Guidelines of Quality Control in Cosmetics from Brazil. Still regarding the preliminary safety test, with the HET-CAM test, HEA did not promote additional irritative effect, showing the same response of the shampoo base formulation. In the cytotoxicity assay with keratinocytes, HEA showed cell viability above 70% and its incorporation into the shampoo did not promote additional cytotoxicity to the formulation. Thus, the results obtained in the present study indicate that the incorporation of HEA at 2.5% to the shampoo base is stable and safe. The phenolic compounds present in HEA offer a considerable antioxidant power, which may be beneficial to the treatment of dermatological conditions that affect the scalp. Findings from this study indicate an important economic and environmental bioprospecting, suggesting a promising alternative and a noble destination for *A. mearnsii* aerial parts, which, nowadays, are usually discarded.

Keywords: *Acacia mearnsii*;shampoo;cytotoxicity;cell culture;safety test;cosmetics

Orientador: EDNA SAYURI SUYENAGA

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284396>



Trabalho de Conclusão

Título: USO DE MANCHAS DE SANGUE SECO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DO METABOLISMO NÃO OXIDATIVO DO ETANOL

Autor: MARIANE TEGNER

Abreviatura: TEGNER, M.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 25/02/2022

Resumo: O álcool é a droga lícita mais consumida no mundo e, conseqüentemente, um dos maiores contribuintes para injúrias e mortalidade. Atuais parâmetros que auxiliam no diagnóstico do consumo são considerados inespecíficos, pois refletem o efeito tóxico do etanol nos órgãos. Os produtos do metabolismo não oxidativo do etanol, são considerados marcadores diretos de consumo e mais específicos por serem derivados da molécula do etanol. Entre os principais marcadores estão etil glicuronídeo (EtG), etil sulfato (EtS) e fosfatidiletanol (PEth), estes, possuem tempo de meia-vida mais longa que o etanol e janela de detecção mais estável. No sangue, EtG e EtS possuem o potencial de identificar o consumo recente de etanol, ao passo que o PEth permite diferenciar abstinências e consumo excessivo em virtude de sua janela de detecção de 3 a 4 semanas. A técnica de microamostragem empregando sangue seco em papel (DBS) vem acompanhada de vantagens analíticas, contribui para a estabilidade do analito, trabalha com quantidade de amostras reduzidas, a coleta é considerada não invasiva e reduz o potencial infectante por inativar patógenos. Explorando essa peculiaridade e especificidade na avaliação do consumo de etanol, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas utilizando a técnica de microamostragem DBS para determinação de EtG, EtS e PEth. Dois métodos foram desenvolvidos, um para a determinação de EtG e EtS e outro para o PEth, utilizando manchas de DBS com 8 mm de diâmetro, a detecção dos componentes foi alcançada usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). Para os metabólitos do consumo recente, o tempo de corrida cromatográfica foi de 10 minutos, método foi linear para os intervalos de 0,10 a 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EtG e 0,02 a 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EtS. Recuperação média foi de 76%. Não houve impacto significativo do Hct na exatidão e todos parâmetros atenderam aos quesitos de validação. O DBS capilar apresentou comparabilidade com sangue venoso e DBS de sangue venoso na análise de bablok e bland altman, com coeficiente de correlação $>0,91$ ($p<0,001$) para todas as comparações. Na aplicação post-mortem, as análises DBS EtG e EtS indicaram exposição positiva ao etanol em 72,7% dos casos (EtG: 0,10 a 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e EtS: 0,03 a 4,11). A identificação do consumo de etanol a partir da alcoolemia e dos níveis de metabólitos no DBS foram concordantes em 98,6% dos casos positivos e 96,3% dos casos negativos (κ 0,877, $p<0,001$), indicando um alto nível de concordância com o BAC na avaliação uso de álcool em amostras post mortem. Para o método de determinação de PEth, o tempo total de corrida foi de 6 minutos. Método se mostrou linear para o intervalo de 10 a 3000 ng mL^{-1} . Não se observou impacto significativo do hematócrito na exatidão e todos parâmetros atenderam aos quesitos de validação. A comparabilidade entre sangue capilar e DBS venoso foi satisfatória com CV $r=0.994$ ($p>0.001$) assim como a aplicação do método na avaliação do consumo de álcool por DBS de punção capilar em pacientes em reabilitação, as concentrações variaram de 14,5 a 2380,8 ng mL^{-1} , demonstrando adequada performance para aplicação clínica. Por sua vez, a utilização de metabólitos não oxidativos em DBS se mostra uma estratégia útil para avaliar o consumo de álcool.

Palavras-Chave: Etanol;EtG e EtS;PEth;Dried Blood Spot;UHPLC MS MS

Abstract: Alcohol is the most consumed licit drug in the world and, consequently, one of the biggest contributors to injuries and mortality. Current parameters that contribute for the diagnosis of alcohol consumption are considered non-



specific, as they detect the toxic effect of ethanol on organs. The products of the non-oxidative metabolism of ethanol are considered direct indicators of consumption and more specific by deliveries of the product of the ethanol molecule. Among the main markers are ethyl glucuronide (EtG), ethyl sulfate (EtS) and phosphatidylethanol (PEth), these have a longer lifetime than ethanol and a more stable detection window. In blood, EtG and EtS have the potential to identify recent consumption, while PEth allows differentiating between abstainers and excessive consumption due to its detection window of 3 to 4 weeks. The microsampling technique using dried blood spot (DBS) comes with analytical advantages, contributes to the stability of the analyte, works with reduced samples, collection is considered non-invasive and reduces the infective potential by inactivating pathogens. Exploring this peculiarity and specificity in the evaluation of ethanol consumption, this study aimed to develop and validate analytical methodologies using the DBS microsampling technique to determine EtG, EtS and PEth. Two methods were developed, one for the determination of EtG and EtS and another for PEth, using 8 mm diameter DBS spots, the detection of the components was achieved using ultra performance liquid chromatography coupled to a sequential mass spectrometer (UHPLC- MS/MS). For recent consumption metabolites the chromatographic run time was 10 minutes, the method was linear for the intervals of 0.10 to 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EtG and 0.02 to 6.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EtS. Average recovery was 76%. There was no significant impact of Hct on accuracy and all parameters met the validation requirements. Capillary DBS showed comparability with venous blood and venous blood DBS in the bablok and bland altman analysis, with a correlation coefficient >0.91 ($p<0.001$) for all comparisons. In the post mortem application, DBS EtG and EtS analyzes indicated positive exposure to ethanol in 72.7% of cases (EtG: 0.10 to 24.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and EtS: 0.03 to 4.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The identification of ethanol consumption from BAC and metabolite levels in DBS were in agreement in 98.6% of positive cases and 96.3% of negative cases (κ 0.877, $p<0.001$), indicating a high level of agreement. With the BAC in the assessment of alcohol use in post mortem samples. For the PEth determination method, the total run time was 6 minutes. Method proved to be linear for the range from 10 to 3000 ng mL^{-1} . There was no significant impact of Hct on accuracy and all parameters met the validation requirements. The comparability between capillary blood and venous DBS was satisfactory with CV $r=0.994$ ($p> 0.001$) as well as the application of the method in the evaluation of alcohol consumption by fingerpricked DBS in patients undergoing rehabilitation, concentrations ranged from 14.5 to 2380.8 ng mL^{-1} , demonstrating adequate performance for clinical application. The use of non-oxidative metabolites in DBS proves to be a useful strategy to assess alcohol consumption.

Keywords: Ethanol;EtG and EtS;PEth;Dried Blood Spot;UHPLC MS MS

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Disponível em acervo: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282900>

