

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Dissertações – 2021



Trabalho de Conclusão

Título: EMPREGO DE ESTRATÉGIAS DE AMOSTRAGEM ALTERNATIVAS NO MONITORAMENTO DA TERAPIA COM CLOZAPINA EM PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS

Autor: ELIANA CARNIEL

Abreviatura: CARNIEL, E.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/07/2021

Resumo: Pacientes com esquizofrenia normalmente tem dificuldade de se inserir em sociedade. A clozapina (CLZ) é classificada como um antipsicótico atípico, muito utilizado em esquizofrenia resistente ao tratamento. Com efeitos colaterais já conhecidos, ao ser administrada e com o devido acompanhamento clínico, obtêm-se uma boa adesão à terapia e excelente resposta ao tratamento. No monitoramento terapêutico, o padrão ouro é a dosagem do fármaco em soro ou plasma colhido em vale por punção venosa. Como forma alternativa para essa avaliação, as amostras secas surgem com uma boa correlação entre facilidade de coleta, agilidade na análise e resultados satisfatórios. Com isso, este trabalho vem com a proposta de validar uma técnica para a utilização de microamostras de sangue seco (Dried Blood Spot - DBS) e plasma seco em papel (Dried Plasma Spot - DPS) como alternativa no monitoramento terapêutico; empregando a cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas em sequencial (HPLC-MS/MS) para a dosagem do fármaco, essa técnica garante um bom limiar de detecção além de permitir o uso de baixos volumes de material. O método foi linear 50 a 1500 ng mL⁻¹ ($r > 0.99$), com ajuste ponderal de 1/x. A exatidão foi de 98 a 105% para DBS e 91 a 101% para DPS para a CLZ e metabólito NOR, precisão intra e entre dias foi de CV 5,23 a 9,35% para DBS e 2,22 a 11,36% para DPS em ambos os analitos. O rendimento de extração médio foi de 65% para CLZ e 64% para NOR. O efeito matriz foi compensado pelo uso de padrão interno, sendo de -5,1 a 6,89% para DBS e -2,45 a 5,74% para DPS. Nos ensaios de estabilidade, as matrizes secas se mantiveram estáveis de 4 a 42°C por até 25 dias sem sofrer interferências significativas. O método foi aplicado na avaliação da terapia com clozapina em 13 pacientes esquizofrênicos com níveis séricos médios de 401 ng mL⁻¹ (43 a 914 ng mL⁻¹). Apenas 38% estavam dentro da faixa terapêutica, 46% abaixo e 23% acima. Ambas as matrizes secas tiveram alta correlação com níveis séricos, com maior exatidão para DPS em relação a DBS (CLZ 97 vs 89%) e NOR (99 vs 131%), mesmo utilizando dispositivo volumétrico para DBS, em virtude da distribuição entre plasma e eritrócitos. Os resultados do estudo sugerem a aplicabilidade das estratégias de amostragem alternativas DBS e DPS no monitoramento da terapia com a CLZ.

Palavras-Chave: Monitoramento terapêutico, clozapina; norclozapina; dried blood spot; dried plasma spot; HPLC/MSMS.

Abstract: Patients diagnosed with schizophrenia usually have difficulty in social inclusion. Medications used in their treatment usually require a longer follow-up to prevent severe side effects and then get better adherence to therapy. Clozapine (CLZ) is classified as an atypical antipsychotic widely used in treatment-resistant schizophrenia. With known side effects, when administered with proper follow-up, good adherence to therapy and excellent response to treatment are obtained. As the gold standard in therapeutic monitoring, the dosage of CLZ in serum or plasma collected in a trough by venipuncture is used. As an alternative way to obtain results, dry samples appear with a good correlation between ease of collection, agility in analysis and satisfactory results. In this scenario, this work comes with the proposal of validating a technique for the use of microsamples of dried blood (Dried Blood Spot - DBS) and dried plasma on paper (Dried Plasma Spot - DPS) as an alternative dosage and therapeutic monitoring, with analysis in high performance liquid chromatography associated with sequential mass spectrometry (HPLC-MS/MS). This technique guarantees a good



detection threshold in addition to allow the use of low volumes of sample. The developed method presented linearity between 50 to 1500 ng mL⁻¹ ($r > 0.99$), with ponderal adjustment of $1/x$. Accuracy was 98 to 105% for DBS and 91 to 101% for DPS for CLZ and NOR metabolite analytes. The precision in the same day and between days was 5.23 to 9.35% for DBS and 2.22 to 11, 36% for DPS on both analytes. The extraction performance obtained in the analyzes was 63 to 67% for CLZ and 58 to 69% for NOR. The matrix effect was compensated by the use of a deuterated internal standard, being -5.1 to 6.89% for DBS and -2.45 to 5.74% for DPS. In the stability tests, the dry matrices remained stable from 4 to 42°C for up to 25 days without suffering significant interference. The method was applied in the evaluation of clozapine therapy in 13 schizophrenic patients with mean serum levels of 401 ng mL⁻¹ (43 to 914 ng mL⁻¹). Only 38% were within the therapeutic range, 46% below and 23% above. Both dried matrices had a high correlation with serum levels, with greater accuracy for DPS compared to DBS (CLZ 97 vs 89%) and NOR (99 vs 131%), even using a volumetric device, due to the distribution between plasma and erythrocytes. The study results suggest the applicability of alternative sampling strategies DBS and DPS in monitoring CLZ therapy.

Keywords: Therapeutic monitoring, clozapine; norclozapine; dried blood spot; dried plasma spot; HPLC/MS-MS.

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282227>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DA POTENCIAL TOXICIDADE IN VITRO DOS INFUSOS DE CISSUS SICYOIDES L. E WEDELIA PALUDOSA DC **Autor:** AMANDA SCHU PONATH

Abreviatura: PONATH, A. S.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/07/2021

Resumo: O diabetes mellitus é uma doença crônica que atinge cerca de 425 milhões de pessoas ao redor do mundo. Seu tratamento está, em muitos casos, fora do alcance de parte da população. Como a hiperglicemia decorrente do diabetes leva a uma produção de radicais livres de oxigênio e, conseqüentemente, estresse oxidativo, existem vários antioxidantes naturais que eliminam esses radicais e podem prevenir dano oxidativo nas membranas biológicas. Deste modo, plantas medicinais têm sido empregadas com o objetivo de tratar essa doença. Uma delas é a *Cissus sicyoides* L., planta originária da região Amazônica com efeito hipoglicêmico. Essa planta é muito similar à *Wedelia paludosa* DC., planta comumente encontrada no Rio Grande do Sul. Entretanto, metabólitos secundários ligados a alguma atividade tóxica já foram identificados em *W. paludosa*, embora ambas as plantas não tenham sua toxicidade totalmente elucidada. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível toxicidade dos infusos das folhas de *Cissus sicyoides* e *Wedelia paludosa*. Foi realizada a triagem fitoquímica dos infusos, sendo encontrados compostos fenólicos e alcaloides em ambos e cumarinas em *W. paludosa*. Foi avaliada a atividade antioxidante total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP), encontrando $748,0 \pm 104,5$ M para *C. sicyoides* e $1971,5 \pm 141,0$ M para *W. paludosa*. A atividade de inibição da enzima alfa-glicosidase foi avaliada em $55,2 \pm 1,7$ % para *C. sicyoides* e $85,8 \pm 9,7$ % para *W. paludosa*. Foi realizada a quantificação de compostos fenólicos em cada infuso, com *C. sicyoides* apresentando $1,36 \pm 0,04$ mg/PAE e *W. paludosa*, $3,27 \pm 0,07$ mg/PAE. A formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) foi avaliada pelo método de DCFH-DA, sendo verificada maior formação no infuso de *W. paludosa* em comparação ao de *C. sicyoides*. Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células de fibroblastos 3T3. A viabilidade celular após exposição dos infusos foi verificada pelos métodos de Sulforrodamina B e MTT. O infuso de *W. paludosa* apresentou viabilidade próxima ao padrão positivo a partir da concentração de 2 mg/mL, enquanto que *C. sicyoides* demonstrou baixa viabilidade celular com diferença estatística significativa do controle negativo apenas na maior concentração. Além disso, foi investigado o mecanismo de morte celular a partir dos testes de Laranja de Acridina e Lactato Desidrogenase, tendo o infuso de *W. paludosa* apresentado indicação de morte por necrose. Os dados obtidos com estes ensaios sugerem a importância da continuação dos estudos das suas propriedades, uma vez que sugerem a possível baixa toxicidade do infuso de *C. sicyoides* e alta de *W. paludosa*.

Palavras-Chave: Antioxidante; MTT. DCFH-DA. *Wedelia paludosa*. *Cissus sicyoides*.

Abstract: Diabetes mellitus is a chronic disease presented by approximately 425 million people worldwide. Frequently, its treatment is out of reach for a significant amount of the population. As the hyperglycemia due to diabetes leads to the generation of reactive species of oxygen (ROS) hence oxidative stress, there are many natural antioxidants that eliminate these ROS and may prevent oxidative damage on cell membranes. Thus, medicinal plants have been employed to treat this disease. One of them is *Cissus sicyoides*, a plant from the Amazon region known for its hypoglycemic effect. This plant is similar to *Wedelia paludosa*, a plant easily found in Rio Grande do Sul. However, secondary metabolites linked to some toxic activity have been already identified in *W. paludosa*, although both plants do not have their toxicity totally clarified. Thus, this study aimed to assess the potential toxicity of *C. sicyoides* and *W.*



paludosa's leaves water extracts. A phytochemical trial was employed and phenolic compounds and alkaloids were found in both water extracts and coumarins in *W. paludosa*'s water extract. Total antioxidant power was measured by the ferric reduction assay. *C. sicyoides* demonstrated a total antioxidant activity of 748.0 ± 104.5 M and *W. paludosa*, 1971.5 ± 141.0 M. Both extracts were tested for the inhibition of the Alpha-glucosidases enzyme. *C. sicyoides* showed an inhibition rate of 55.2 ± 1.7 % and *W. paludosa*, 85.8 ± 9.7 %. Phenolic compounds were quantified in both extracts. *C. sicyoides* showed the presence of 1.36 ± 0.04 mg/PAE and *W. paludosa*, 3.27 ± 0.07 mg/PAE. The formation of Reactive Oxygen Species (ROS) was evaluated by the DCFH-DA method, its formation being higher in *W. paludosa*'s water extracts than in *C. sicyoides*. Fibroblasts Balb/c 3T3 cell line were used for cytotoxicity assays. Cell viability after extracts' exposure was evaluated by the Sulforhodamine B and MTT Assays. *W. paludosa*'s extract presented a cell viability close to positive control starting from 2 mg/mL to 30 mg/mL concentrations, while *C. sicyoides* only demonstrated statistical significant low viability at the highest concentration when compared to the negative control. Moreover, cell death mechanism was also investigated by the Acridine Orange and Lactate Dehydrogenase assays, having *W. paludosa*'s extract suggested death by necrosis. Data obtained by these trials suggest the importance of more studies on the extracts' properties, once results may suggest low toxicity for *C. sicyoides*' extract and high toxicity for *W. paludosa*'s extract.

Keywords: Antioxidant; MTT. DCFH-DA. *Wedelia paludosa*. *Cissus sicyoides*.

Orientador: MAGDA SUSANA PERASSOLO

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282003>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A TERAPIA MEDICAMENTOSA EM PACIENTES INTERNADOS PARA TRATAMENTO DE DEPENDÊNCIA POR COCAÍNA.

Autor: ISABELA LORINI FRANCISCATTO

Abreviatura: FRANCISCATTO, I. L.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 25/02/2021

Resumo: O uso da cocaína afeta vários sistemas e órgãos e estudos têm mostrado que o consumo da substância leva a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e uma redução das defesas antioxidantes. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de estresse oxidativo (EO), bioquímicos e hematológicos e associá-los a terapia medicamentosa realizada por pacientes internados para tratamento da dependência por cocaína, comparando os níveis séricos no momento da admissão e na alta hospitalar. Quarenta pacientes foram incluídos no estudo. O EO foi verificado através da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GPx), poder antioxidante total (FRAP), níveis de malondialdeído (MDA) e grupamento sulfidril (GS). Os medicamentos utilizados durante a internação foram registrados e sua influência sobre os parâmetros de EO analisada. Após o período de internação, observou-se um aumento nos níveis de GGT, redução na atividade da SOD e aumento na atividade de GPx e nos níveis de FRAP. Usuários de carbamazepina apresentaram valores mais altos de SOD e menores de FRAP na alta hospitalar. O uso da clorpromazina provocou diferença nos parâmetros de creatinina e gamaglutamiltransferase (GGT), e os níveis de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), MDA e FRAP ficaram aumentados na alta hospitalar. O haloperidol e a tiamina durante a internação interferiram nos níveis de fosfatase alcalina. A utilização de risperidona provocou aumento na dosagem de SOD, e o ácido fólico níveis menores de GPx e maiores de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina. Neste estudo pode-se perceber que os parâmetros relacionados com danos hepáticos tiveram melhorias durante a internação, mas não se pode excluir a interferência do uso de múltiplos medicamentos concomitantemente. Os resultados sugerem que o tratamento de reabilitação medicamentosa foi eficaz na diminuição do dano oxidativo.

Palavras-Chave: cocaína; estresse oxidativo; dependência química; bioquímica; terapia medicamentosa

Abstract: The use of cocaine affects several systems and organs and studies have shown that consumption of the substance leads to an increase in the production of reactive oxygen species, and a reduction in antioxidant defenses. The objective of this study was to evaluate the oxidative stress (OE), biochemical and hematological parameters and associate them with drug therapy performed by inpatients for the treatment of cocaine addiction, comparing serum levels at admission and at discharge. Forty patients were included in the study. EO was verified through catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GPx), total antioxidant power (FRAP), levels of malondialdehyde (MDA) and sulfhydryl group (GS). The drugs used during hospitalization were registered and their influence on the parameters of EO analyzed. After the hospitalization period, there was an increase in gammaglutamyltransferase (GGT) levels, a reduction in SOD activity and an increase in GPx activity and FRAP levels. Carbamazepine users evaluate higher SOD values and lower FRAP values at hospital discharge. The use of chlorpromazine caused a difference in the parameters of creatinine and GGT, and the levels of glutamic oxalacetic transaminase (TGO), MDA and FRAP considered increased at hospital discharge. Haloperidol and thiamine during hospitalization interfered with alkaline phosphatase levels. The use of risperidone caused an increase in the dosage of SOD, and the folic acid lower levels of



GPx and higher levels of glutamic-pyruvic transaminase (TGP) and alkaline phosphatase. In this study, it can be seen that the parameters related to liver damage improve during hospitalization, but the interference from the use of multiple concomitant drugs cannot be excluded. The results obtained that the drug rehabilitation treatment was effective in reducing oxidative damage.

Keywords: cocaine;oxidative stress;chemical dependence;biochemistry;drug therapy

Orientador: MAGDA SUSANA PERASSOLO

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/280085>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO IN VITRO DA TOXICIDADE E DO PODER COAGULANTE DE UM PÓ HEMOSTÁTICO A BASE DE COLÁGENO SUBPRODUTO DE CURTUME, QUITOSANA E SILICATO DE CÁLCIO

Autor: FABIO CLOSS

Abreviatura: CLOSS, F.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2021

Resumo: Existem muitos produtos para cicatrização cutânea que atendem necessidades variadas. A busca de novas formulações e sua aplicação na medicina humana e veterinária são um desafio constante para os pesquisadores. Neste trabalho foi incorporado colágeno proveniente de subprodutos de curtumes em formulação de pó hemostático, avaliando a citotoxicidade e o poder coagulante in vitro a fim de garantir sua segurança e eficiência. O trabalho possui caráter inovador, busca agregar maior valor ao subproduto e respeita os princípios de consciência ecológica. A formulação 1G foi desenvolvida com 0,15% de colágeno, 0,25% de quitosana e 0,50% de silicato de cálcio, enquanto na 2G foi alterado somente o percentual de quitosana para 0,125%. Os componentes foram pesados e solubilizados em ácido láctico 1%, e as misturas foram congeladas, liofilizadas e moídas. Na caracterização morfológica, 1G apresentou estrutura folicular e 2G mais granular e porosa; já na análise de área superficial 1G resultou em 324,016 m²/g e 2G em 308,700 m²/g. As bandas nos espectros de infravermelho de 1G e 2G apresentaram deslocamento quando comparadas aos componentes das formulações. Na análise termogravimétrica observou-se que as formulações apresentaram perda de massa em mais etapas quando comparadas aos componentes isolados. A toxicidade in vitro do colágeno, da quitosana e do silicato de cálcio isolados e das formulações foi avaliada através da resposta de células HaCat (queratinócitos humanos) após exposição por 24 e 96 horas (ensaios agudo e crônico) ao meio de extração (obtido por 24 horas de contato entre meio de cultivo e os compostos), sendo a viabilidade celular determinada ao final do período pelo ensaio de redução do MTT. Após exposição aguda foi detectada toxicidade para concentrações superiores a 1,0% de colágeno, a 0,25% de quitosana e 5% de silicato de cálcio; já com exposição crônica o colágeno apresentou toxicidade acima de 0,5%, a quitosana acima de 0,5% e o silicato de cálcio em concentrações de 7,5 e 10%. A formulação 1G com concentração 7,50 mg/mL apresentou máximo de 7% de toxicidade e 2G com concentração 15 mg/mL até 25%. Também foi avaliado o poder coagulante in vitro da formulação através da análise da quantidade de pó hemostático e do tempo necessário para coagulação de sangue humano em microtubo, resultando em 120 mg/mL, com 60 segundos para 1G e 30 segundos para 2G. De modo geral, a formulação 1G apresentou resultados mais promissores, sendo necessário ampliar os estudos para equilibrar resultados de toxicidade e coagulação, a fim de obter um produto seguro e eficiente na mesma concentração.

Palavras-Chave: Cicatrização; colágeno, coagulação, citotoxicidade

Abstract: There are many products for skin healing that meet different needs. The preparation of formulations and their application in medicine and veterinary medicine is a challenge for researchers. In this work was to incorporate collagen from tanneries by-products into a hemostatic powder formulation, evaluating the cytotoxicity and coagulation power, both in vitro to ensure your safety and efficiency. The work is innovative, seeks to add greater value to the byproduct and is ecologically conscious. The 1G version was developed with 0.15% collagen, 0.25% chitosan and 0.50% calcium silicate and the 2G only changed the percentage of chitosan to 0.125%. The components were weighed and solubilized. The mixtures were frozen, lyophilized and ground. In the morphological characterization 1G showed follicular structure



and 2G more granular and porous and in the analysis of surface area 1G resulted in 324,016 m²/g and 2G in 308.700 m²/g. The bands in the 1G and 2G infrared spectra showed displacement and the thermogravimetric analysis showed a loss of mass in more steps compared to the components of the formulations. Subsequently, the in vitro toxicity of collagen, chitosan and calcium silicate were evaluated isolated, besides the final formulations. Toxicity was evaluated through the response of HaCaT cells (human keratinocytes) and compared to control cultures. Cultures were incubated in a controlled environment for 24 and 96 hours (acute and chronic assays) and the cell viability was determined using the MTT reduction assay. In acute assay with the extraction medium, toxicity was detected at concentrations above 1.0% of collagen, 0.25% of chitosan and 5% of calcium silicate; after chronic exposure, collagen showed toxicity above 0.5%, chitosan above 0.5% and calcium silicate at concentrations of 7.5 and 10%. The 1G formulation with concentration 7.50 mg/mL showed maximum 7% toxicity and 2G with concentration 15 mg/mL up to 25%. The in vitro coagulation powder of the formulations was also evaluated by analyzing the amount of hemostatic powder and the time required for human blood coagulation in a microtube resulting in 120 mg/mL, with 60 seconds for 1G and 30 seconds for 2G. In general, the 1G formulation showed more promising results, and it is necessary to expand studies to balance toxicity and coagulation results, in order to obtain a safe and efficient product at the same concentration.

Keywords: Healing; collagen, coagulation, cytotoxicity

Orientador: ANA LUIZA ZIULKOSKI

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282228>



Trabalho de Conclusão

Título: UTILIZAÇÃO DO MODELO ALTERNATIVO IN VIVO CAENORHABDITIS ELEGANS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA DO RIO ROLANTE, ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Autor: VINICIUS BLEY RODRIGUES

Abreviatura: RODRIGUES, V. B.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/07/2021

Resumo: A utilização de bioindicadores para análise da toxicidade da água, juntamente com parâmetros normalmente utilizados para avaliar a qualidade da mesma são imprescindíveis. O presente trabalho tem como área de estudo a microbacia do Rio Rolante, utilizando análise multiparamétrica, por meio de modelos alternativos e tradicionais, para avaliar a qualidade e possíveis efeitos tóxicos de suas águas. Foram coletadas amostras no trecho superior (P1), no trecho médio (P2) e no trecho inferior (P3), em dois períodos do ano, contemplando a época de aplicação de pesticidas (coleta 1) e de não aplicação (coleta 2). As amostras foram coletadas diretamente da superfície do fluxo de água de forma asséptica e transportadas sob refrigeração. Foram analisados metais pesados, agentes microbiológicos (coliformes termotolerantes e totais), presença de agrotóxicos, bem como realizada a avaliação de toxicidade utilizando o Teste de Ames e o modelo *C. elegans*. Os coliformes e os metais manganês e cobre, apresentaram níveis acima dos valores máximos permitidos (VMP) pela legislação brasileira, de forma acentuada na coleta 2 em relação à coleta 1. A presença de pesticidas nas amostras de águas foi observada em ambas as coletas, porém com presença elevada na coleta 1. Com os resultados do Teste de Ames, não foi observado efeito mutagênico nos tratamentos. Quanto ao desenvolvimento de *C. elegans*, houve redução significativa no tamanho dos nematoides, quando comparado ao grupo controle, na coleta 1 em P2 ($p < 0,001$) e P3 ($p < 0,001$), e na coleta 2, apenas em P2 ($p = 0,004$). Quando comparados os mesmos pontos amostrais nas duas coletas, verificou-se diferença significativa entre as coletas em P2 ($p = 0,004$) e P3 ($p = 0,025$). O modelo *C. elegans* se mostrou sensível para avaliação da toxicidade de águas superficiais, sendo que o modelo do Teste de Ames não indicou efeitos mutagênicos para organismo unicelular, nas amostras. A análise conjunta dos parâmetros avaliados neste trabalho poderá ser empregada como subsídio para utilização de *C. elegans* como bioindicador em futuros estudos para avaliação da água.

Palavras-Chave: Poluição; Agrotóxicos, Bioindicadores, *C. elegans*, Teste de Ames

Abstract: The use of bioindicators to analyze the toxicity of water, together with parameters used to assess its quality, are essential. The present work has as an area of study the microbasin of the Rolante River, using multiparametric analysis, through alternative and traditional models, to evaluate the quality and possible toxic effects of its waters. They were collected without upper stretch (S1), without middle stretch (S2) and without lower stretch (S3), in two periods of the year, considering the time of application of pesticides (collection 1) and non-application (collection 2). As they were collected directly from the surface of the water flow in an aseptic manner and transported under refrigeration. Heavy metals, microbiological agents (thermotolerant and total coliforms), presence of pesticides were transported, as well as the evaluation of toxicity using the Ames Test and the *C. elegans* model. Coliforms and manganese and copper metals were detected with reference values (RV) above those recommended by Brazilian legislation, significantly in collection 2 compared to collection 1. The presence of pesticides in water was observed in both collections, however with high presence in collection 1. With the results of the Ames Test, no mutagenic effect was observed in the treatments. As for the development of *C. elegans*, there was a reduced reduction in the size of nematodes, when compared to the control



group, in collection 1 in P2 ($p < 0.001$) and P3 ($p < 0.001$), and in collection 2, only in P2 ($p = 0.004$). When comparing the same sampling points in the two collections, there was a difference between the collections in P2 ($p = 0.004$) and P3 ($p = 0.025$). The *C. elegans* model is sensitive for the assessment of surface water toxicity, and the Ames Test model does not indicate mutagenic effects of. The joint analysis of the parameters extracted in this work can be used as a subsidy for the use of *C. elegans* as a bioindicator in future studies for water evaluation.

Keywords: Pollution; Pesticides, Bioindicators, *C. elegans*, Ames test.

Orientador: MARIELE FEIFFER CHARAO

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282331>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE UMA MOLÉCULA COM POTENCIAL ANTIPSICÓTICO, PT-31

Autor: CASSIANA BIGOLIN

Abreviatura: BIGOLIN, C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/07/2021

Resumo: A esquizofrenia apresenta uma heterogenidade de sintomas e seu tratamento é baseado nos antipsicóticos típicos e atípicos, os quais possuem uma variedade de efeitos adversos que interferem na qualidade de vida do paciente. Diante disso é necessário o desenvolvimento de novas moléculas seguras e eficazes para o tratamento desta doença. O derivado imidazolidínico 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, PT-31, vem demonstrando resultados promissores pela via oral em modelos in vivo, como um potencial antipsicótico. Entretanto, um estudo recente sugeriu um potencial genotóxico e mutagênico de PT-31 após tratamento agudo por via intraperitoneal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de PT-31 em induzir danos genotóxicos ou mutagênicos após tratamento agudo pela via oral, em camundongos. Para isso camundongos adultos BalbC, machos e fêmeas, foram tratados agudamente pela via oral com controle ou PT-31, em 3 diferentes doses (10, 20 e 40 mg/kg). Após 24h os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e fêmures, para a realização do ensaio cometa e teste de micronúcleos (MN), respectivamente. Nenhum dos grupos testados com a molécula apresentaram aumento significativo no índice de dano ao DNA e na frequência de MN. Ainda na dose efetiva de 10 mg/kg os camundongos machos aumentaram significativamente a taxa de linfócitos policromáticos por linfócitos normocromáticos (PCE/NCE). Considerando que o presente estudo avaliou a via oral, onde há formação de metabólitos, após 24 horas não foi possível encontrar danos significativos, talvez por poder ocorrer reparos ao DNA. A farmacocinética pode ser uma das grandes responsáveis pelos diferentes resultados encontrados no presente trabalho em relação à administração via intraperitoneal. Ainda a relação PCE/NCE é um indicador de citotoxicidade podendo representar uma aceleração ou inibição da hematopoiese, apesar de PT-31 não causar alterações hematológicas após tratamento subcrônico in vivo. Portanto, a molécula PT-31 parece não apresentar efeitos genotóxicos e mutagênicos em camundongos, demonstrando ser mais segura pela via oral do que pela via intraperitoneal. Além disso, este estudo vem a reforçar o perfil atípico da molécula como um potencial antipsicótico.

Palavras-Chave: Antipsicótico;PT-31, genotoxicidade, mutagenicidade.

Abstract: Schizophrenia presents a heterogeneity of symptoms and its treatment is based on typical and atypical antipsychotics which present a variety of side effects that interfere with the patient's quality of life. Therefore, it is necessary to develop new safe and effective molecules to treat this disease. The imidazolidine derivative 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione, PT-31, has shown promising results when administered orally in in vivo models as a potential antipsychotic. However, a recent study suggested genotoxic and mutagenic potential of PT-31 after acute intraperitoneal treatment. Thus, this study aimed to evaluate the potential of PT-31 to induce genotoxic or mutagenic damage after acute oral treatment in mice. For this purpose, adult male and female BalbC mice were acutely orally treated with control or PT-31 in three different doses (10, 20 and 40 mg/kg). After 24 hours, the mice were euthanized to collect blood samples and femurs in order to perform the comet assay and micronucleus (MN) assay, respectively. None of the groups tested with the molecule showed a significant increase in DNA damage index and MN frequency.



Even at the effective dose of 10 mg/kg, male mice significantly increased polychromatic lymphocytes per normochromatic lymphocytes (PCE/NCE) rate. Considering the present study evaluated oral route where there is formation of metabolites, after 24 hours it was not possible to identify any significant damage perhaps due to DNA repair that may occur. Pharmacokinetics may be one of the main factors responsible for the different results found on the present study in relation to intraperitoneal administration. Also, PCE/NCE ratio is an indicator of cytotoxicity and may represent an acceleration or inhibition of hematopoiesis, although PT-31 does not cause hematological alterations after subchronic in vivo treatment. Therefore, the PT-31 molecule seems not to present genotoxic and mutagenic effects in mice, demonstrating it to be safer when administered orally than by intraperitoneal route. Furthermore, this study reinforces the atypical profile of the molecule as a potential antipsychotic.

Keywords: Antipsychotic; genotoxicity, mutagenicity, PT-31.

Orientador: ANDRESA HEEMANN BETTI

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282223>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE MICROAMOSTRAGEM APLICADAS AO MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE GENTAMICINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS

Autor: ANA LAURA ANIBALETTO DOS SANTOS

Abreviatura: SANTOS, ANA

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 19/02/2021

Resumo: O antibiótico sulfato de gentamicina (GEN), pertencente à classe dos aminoglicosídeos, é um fármaco de largo espectro utilizado como primeira escolha no tratamento de infecções por bactérias Gram negativas em pacientes pediátricos. As diferenças fisiológicas decorrentes do processo normal de maturação dos recém-nascidos (RN) tornam este grupo importante quanto à realização do monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), uma vez que ocorrem alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas na exposição à GEN nesta população. Normalmente a amostra de escolha para a realização do MT de GEN é o plasma, no entanto como forma de minimizar os efeitos traumáticos decorrentes da punção venosa, estratégias de microamostragem tem se mostrado útil, como o dried blood spots (DBS). Desse modo, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação analítica de estratégias de microamostragem para uso na individualização de dose de GEN. Foram desenvolvidos e validados métodos em plasma, empregando extração em fase sólida (EFS) e DBS para a determinação de GEN, ambos associados a equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial (CLUE-EM/EM). Os ensaios bioanalíticos apresentaram desempenhos adequados, conforme os guias internacionais de validação. As metodologias foram aplicadas a amostras provenientes de pacientes pediátricos em uso de antibioticoterapia de GEN. O uso de DBS para mensuração das concentrações de GEN poderia contribuir para um maior acesso ao MT de GEN, pela facilidade de coleta de amostras em pacientes neonatos e também pela simplicidade logística.

Palavras-Chave: Gentamicina;CLUE-EM/EM;microamostragem;sangue seco em papel;monitoramento terapêutico de fármacos;neonatos.

Abstract: The antibiotic gentamicin sulfate (GEN), belonging to the class of aminoglycosides, is a broad spectrum drug used as the first choice in the treatment of Gram negative bacteria in pediatric patients. The physiological differences resulting from the normal maturation process of new borns (NB) make this group important regarding the performance of therapeutic drug monitoring (TDM), since pharmacokinetic and pharmacodynamic changes occur in exposure to GEN in this population. Normally the sample of choice for performing the MT of GEN is plasma, however as a way to minimize the traumatic effects of venipuncture, a micro sampling strategy has been useful, such as dried blood spots (DBS). Thus, this study aimed at the development and analytical validation of micro sampling for use in individualizing the dose of GEN. Plasma methods were developed and validated, using solid phase extraction (SPE) and DBS to determine GEN, both associated with ultra efficient liquid chromatography equipment coupled to sequential mass spectrometer (UHPLC-MS/MS). Bioanalytical tests are adequate, according to international validation guides. The methodologies applied to pediatric patients using GEN antibiotic therapy. The use of DBS to measure the needs of GEN could contribute to greater Access to the MT of GEN, due to the ease of collecting patients in neonatal patients and also due to its logistical simplicity.



Keywords: Gentamicin;UHPLC-MS/MS;microsampling;dried blood spots;therapeutic drug monitoring;neonates.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/279233>



Trabalho de Conclusão

Título: DETERMINAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DIÁRIA PERMITIDA (PDE) DE EXTRATO SECO DE GINKGO BILOBA UTILIZADO COMO ATIVO EM UM PRODUTO FARMACÊUTICO

Autor: LILIANE WEBER BOLFE LAMB

Abreviatura: LAMB, L. W. B.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/07/2021

Resumo: No Brasil, a publicação da RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019 e 14 Instruções Normativas se tornou um marco regulatório para as Boas Práticas de Fabricação. Esta norma dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos, na qual a ANVISA exige que as empresas possuam um Gerenciamento de Risco da Qualidade, que além de incluir precauções para mitigar a contaminação cruzada, deverá realizar uma avaliação toxicológica de todas as substâncias ativas presentes nas áreas de fabricação multipropósito. Neste contexto, surgiu a determinação da exposição diária permitida (PDE), que é a dose específica de uma substância que é improvável de causar algum efeito adverso em um indivíduo exposto todos os dias ao longo da vida por meio de dados de estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a PDE do Extrato Seco de Ginkgo biloba, obtido das folhas desta planta, utilizado como insumo em um produto farmacêutico sólido administrado por via oral a partir de estudos pré-clínicos em camundongos. A escolha do Ginkgo biloba se deu em função desta planta ser classificada como a quarta maior planta com efeitos adversos relatados, e dentre os mesmos estão, distúrbios gastrointestinais, reações alérgicas cutâneas, hipotensão, palpitações, hemorragias, entre outros. Diante disso, foram realizados testes de toxicidade oral aguda baseado na norma da OECD 423 com três camundongos machos e fêmeas que receberam dose única de 2000 mg/kg de Extrato seco de Ginkgo biloba e foram observados por 14 dias. Também, o teste de toxicidade de doses repetidas baseado na norma da OECD 407 através da administração de Extrato seco de Ginkgo biloba nas doses de 120, 240 e 480 mg/Kg, com dez camundongos por grupo e avaliados por 28 dias. Por fim, foi realizada a avaliação de genotoxicidade por meio de ensaios cometa que verificou o índice de dano nos linfócitos e micronúcleo que determinou os linfócitos imaturos policromáticos da medula óssea e tratamento diferenciando os eritrócitos em policromáticos e normocromáticos. Os resultados obtidos indicaram que o Extrato Seco das folhas de Ginkgo biloba possui baixa toxicidade aguda, não possui toxicidade hepática, nem altera a glicemia em machos e fêmeas. Alterações no ganho de peso não foram demonstradas nos grupos testados, porém os machos reduziram o consumo de ração na primeira semana de tratamento na dose mais elevada de extrato (480 mg/Kg). Nenhum parâmetro hematológico dos machos foi alterado, enquanto para as fêmeas observou-se redução de leucócitos e linfócitos e aumento de neutrófilos na dose de 480 mg/Kg. O perfil lipídico dos machos não apresentou alterações nas doses avaliadas, diferente dos resultados obtidos pelas fêmeas em que na dose de 480 mg/kg houve um aumento do colesterol total. Nos testes de genotoxicidade não foi observada diferença significativa no ensaio de micronúcleo e cometa. Os resultados encontrados no trabalho permitiram calcular a PDE, na qual foi obtido o valor de 0,1 mg/dia; no entanto, ao relacionar com a máxima concentração residual de 250 g/mL, pode-se observar que o processo de limpeza atualmente praticado é seguro e não precisa ser reavaliado.

Palavras-Chave: Contaminação cruzada; exposição diária permitida, Ginkgo biloba, toxicidade.



Abstract: In Brazil, the publication of RDC 301/2019 and the 14 Normative Instructions became the regulatory framework for Good Manufacturing Practices. This regulation establishes general guidelines for good drug manufacturing practices, in which ANVISA requires companies to have a Quality Risk Management that should include precautions to mitigate cross-contamination, in addition to a toxicological evaluation of all active ingredients present in multipurpose manufacturing areas. Within this context, the determination of the Permitted Daily Exposure (PDE) emerged, defined as the specific dose of a substance that is unlikely to cause adverse effects to an individual exposed daily during lifetime based on data from preclinical and clinical studies. Thus, this study aimed to determine the PDE of the dry extract of Ginkgo biloba leaves, utilized as an input in a pharmaceutical solid dosage form administered orally in preclinical studies in mice. Ginkgo biloba was chosen because this plant is the fourth greatest in reported adverse effects, which include gastrointestinal disorders, allergic skin reactions, hypotension, palpitations, hemorrhages, among others. For that reason, acute oral toxicity tests were performed based on the OECD 423 guideline, exposing three male and female mice to a single dose of 2000 mg/Kg body weight of Ginkgo biloba dry extract and monitoring them for 14 days. In addition, the repeated dose toxicity test was performed based on the OECD 407 guideline, with the administration of Ginkgo biloba dry extract at doses of 120, 240 and 480 mg/Kg to 10 mice in each dosing group and evaluated for 28 days. Finally, a genotoxicity assessment was carried out based on comet and micronucleus assays. The former evaluated the DNA damage index in lymphocytes, and the latter determined the polychromatic immature lymphocytes of the bone marrow and treatment differentiated polychromatic and normochromic erythrocytes. The results indicated that the dry extract of Ginkgo biloba leaves causes low acute toxicity, with no liver toxicity or alteration of blood glucose levels in males and females. Changes in weight gain were not demonstrated in the groups tested, but in males, the food intake was lower during the first week of treatment at the highest dose of extract (480 mg/Kg). The hematological parameters were not altered in males, whereas in females receiving 480 mg/Kg there was a reduction of leukocytes and lymphocytes and an increase of neutrophils. The lipid profile of males was not altered by the doses administered, whereas females treated with 480 mg/kg presented higher total cholesterol levels. In the genotoxicity tests, no significant difference was observed in the micronucleus and comet assays. The results found in this work permitted calculation of the PDE, which was estimated at 0.1 mg/day; when correlating to the maximum residual concentration of 250 g/mL, it is concluded that the current cleaning process is safe and does not need to be re-evaluated.

Keywords: Cross contamination;permitted daily exposure, Ginkgo biloba, toxicity.

Orientador: CRISTIANE BASTOS DE MATTOS

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282356>



Trabalho de Conclusão

Título: DETERMINAÇÃO DE CORTISOL EM CABELO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ASSOCIADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE CRÔNICO EM PACIENTES EM TRATAMENTO PARA DEPENDÊNCIA DE ETANOL

Autor: DANIELLA RHEINGANTZ DECKER SOARES

Abreviatura: SOARES, D. R. D.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/07/2021

Resumo: O cortisol é um hormônio glicocorticóide produzido no córtex da adrenal e regulado pelo eixo hipotálamohipófise-adrenal (HPA) que está envolvido em importantes processos fisiológicos e patológicos. É incorporado ao cabelo durante a fase de crescimento, permitindo a análise retrospectiva da secreção do hormônio no período correspondente do crescimento capilar. Estudos indicam que o consumo crônico de álcool está relacionado ao estresse e, consequentemente, ao aumento dos níveis de cortisol. O monitoramento do consumo crônico de álcool pode ser realizado através da determinação de etil glicuronídeo (EtG), um produto de biotransformação do álcool produzido a partir de uma pequena porção de etanol (<1%) no fígado. Neste estudo, foram avaliadas as concentrações de cortisol e EtG em cabelo, com o intuito de correlacionar o estresse crônico ao etilismo. O método de determinação de cortisol em cabelo por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) foi otimizado e validado. Foi utilizado metanol como solente de extração por 4 h a 25 °C. O tempo de corrida foi de 5,5 min. O ensaio foi linear na faixa de 1 a 250 pg mg⁻¹. Os resultados da validação foram: precisão de 3,6 a 12,2%, exatidão de 97,1 a 103,8%, rendimento de extração de 91,6 a 102,3% e efeito de matriz de -13,5 a 1,5%. O método foi aplicado em amostras de cabelo de 19 voluntários (14 homens e 5 mulheres) com idades entre 18 e 61 anos internados para tratamento de dependência de etanol. Foram analisadas as concentrações de cortisol e EtG que apresentaram níveis dentro da faixa linear do ensaio. Grupos de pacientes com abstinência/consumo moderado crônico de etanol apresentaram níveis de cortisol no cabelo significativamente mais baixos quando comparados aos consumidores excessivos crônicos (mediana 6,5 vs 11,62 pg mg⁻¹, p=0,045). Este é o primeiro estudo que avalia os níveis de cortisol no cabelo em consumidores crônicos de etanol, através de um parâmetro objetivo do comportamento de consumo de etanol. A simplicidade e o curto processamento das amostras e o tempo de execução tornam o ensaio acessível para a rotina do laboratório.

Palavras-Chave: Cortisol;cabelo;LC-MS/MS;estresse crônico;dependência de etanol

Abstract: Cortisol is a glucocorticoid hormone produced in the adrenal cortex and regulated by the hypothalamicpituitary-adrenal (HPA) axis, which is involved in important physiological and pathological processes. It is incorporated into the hair during the growth phase, allowing retrospective analysis of hormone secretion in the corresponding period of hair growth. Studies indicate that chronic alcohol consumption is related to stress and, consequently, to increased levels of cortisol. Monitoring chronic alcohol consumption can be performed by the determination of ethyl glucuronide (EtG), an alcohol biotransformation product produced from a minor portion of ethanol (<1%) in the liver. In this study, cortisol and EtG concentrations in hair were evaluated in order to correlate chronic stress with alcoholism. The determination of cortisol in hair by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLCMS/MS) method was optimized and validated. Methanol was used as extraction solution for 4 h at 25 °C. The run time was 5.5 min. The assay was linear in the range of 1 to 250 pg mg⁻¹. The validation results were:



precision of 3.6 to 12.2%, accuracy of 97.1 to 103.8%, extraction yield of 91.6 to 102.3% and matrix effect of -13.5 to 1.5%. The method was applied to hair samples from 19 volunteers (14 men and 5 women) aged between 18 and 61 years old, admitted for treatment of ethanol dependence. Cortisol and EtG concentrations, which presented levels within the linear range of the assay, were analyzed. Groups of patients presenting abstinence/chronic moderate ethanol consumption had significantly lower cortisol hair levels when compared to chronic excessive consumers (median 6.5 vs 11.62 pg mg⁻¹, p=0.045). This is the first study to assess hair cortisol levels in chronic ethanol consumers, using an objective parameter of ethanol consumption behavior. The simplicity and short sample processing and run time make the assay affordable for routine laboratory use.

Keywords: Cortisol;hair;LC-MS/MS;chronic stress;ethanol dependency.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/282226>

