

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Dissertações – 2023



Trabalho de Conclusão

Título: ANÁLISE COMPORTAMENTAL E TOXICOLÓGICA DO EFEITO DA DIETA COM ALTO TEOR DE SACAROSE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS GESTANTES E DA SUA PROLE

Autor: ANDRIELI CAROLINA SCHUSTER

Abreviatura: SCHUSTER, A.C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 28/07/2023

Resumo: A dieta pode desempenhar um papel importante na patogênese de doenças não transmissíveis. A má nutrição materna durante a gestação pode resultar em adaptações metabólicas no útero, provocando consequências imediatas e de longo prazo para a saúde da prole. Neste estudo, avaliou-se os efeitos de uma dieta com alto teor de sacarose em camundongos fêmeas Balb C, analisando o potencial genotóxico, as alterações bioquímicas e hematológicas, bem como o impacto comportamental e toxicológico em seus filhotes na fase adulta. Os animais (n=36) (CEUA nº 02.21.03) com 60 dias (25 ± 5 g), foram divididos em grupos: controle, que recebeu alimentação padrão para camundongos durante todo o experimento; grupo gestação, que recebeu dieta com alto teor de sacarose do momento pré-coito até o nascimento dos filhotes; e grupo lactação, que recebeu dieta com alto teor de sacarose do momento do pré-coito até o desmame dos filhotes. A dieta consiste em um alimento com 70% das calorias totais oriundas de carboidratos, e 46% destas são provenientes da sacarose. Após o desmame (± 21 dias), os filhotes receberam ração padrão ad libitum até o final do experimento. As mães foram eutanasiadas após o desmame, e os filhotes adultos (± 55 dias) foram submetidos ao teste de campo aberto e suspensão pela cauda, após, foram eutanasiados para coleta do material biológico. O sangue foi coletado da veia cava caudal para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e o fêmur foi dissecado para análise das células da medula óssea. Os resultados mostraram uma redução significativa da prole fêmea do grupo gestação em comparação ao grupo controle ($p=0,0243$) quanto ao número de filhotes nascidos. Os filhotes machos do grupo lactação apresentaram massa corporal significativamente maior que o grupo controle até o 42º dia de idade ($p < 0,05$). O consumo alimentar das mães do grupo gestação foi significativamente menor com relação ao controle ($p=0,0005$). Nos testes comportamentais, a prole fêmea do grupo lactação apresentou um aumento no tempo de imobilidade ($p=0,0180$), enquanto a prole masculina desse grupo apresentou maior atividade locomotora em comparação ao controle ($p=0,0041$). A análise bioquímica mostrou que a dieta aumentou os níveis de glicose ($p=0,0177$), colesterol total ($p=0,0471$), LDL ($p=0,0442$) e HDL ($p=0,0243$) nas mães do grupo lactação. Na prole fêmea, também foram observadas alterações no perfil lipídico, especificamente no colesterol total ($p=0,0007$), triglicerídeos ($p=0,0124$) e HDL ($p=0,0164$), não sendo observada toxicidade hepática. O ensaio de genotoxicidade evidenciou aumento de MN na prole fêmea do grupo lactação em comparação ao grupo gestação. Conclui-se que a má nutrição materna, especialmente com alto teor de sacarose durante a gestação e lactação, induz alterações na massa corporal, no perfil comportamental, nos parâmetros bioquímicos e genotóxicos na prole. Esses resultados ressaltam a importância de uma nutrição materna balanceada durante o período gestacional e lactacional para a saúde da prole.

Palavras-Chave: comportamento; genotoxicidade; nutrição materna; sacarose

Abstract: Diets can play an important role in the pathogenesis of non-communicable diseases. Maternal malnutrition during pregnancy can result in metabolic adaptations in the uterus, leading to immediate and long-term consequences for offspring health. In this study, the effects of a high-sucrose diet were evaluated in female Balb C mice, analyzing its potential genotoxicity, biochemical and hematological changes, as well as behavioral and toxicological impacts on their offspring in adulthood. The animals (n=36) (CEUA nº 02.21.03) at 60 days old (25 ± 5 g) were divided into groups:



control, which received standard mouse diet throughout the experiment; pregnancy group, which received a high-sucrose diet from pre-coitus until birth of the offspring; and lactation group, which received a high-sucrose diet from pre-coitus until weaning of the offspring. The diet consisted of food with 70% of total calories derived from carbohydrates, of which 46% were from sucrose. After weaning (± 21 days), the offspring were given ad libitum standard diet until the end of the experiment. The mothers were euthanized after weaning, and the adult offspring (± 55 days) underwent open field and tail suspension tests and were then euthanized for biological material collection. Blood was collected from the caudal vena cava for analysis of hematological and biochemical parameters, and the femur was dissected for analysis of bone marrow cells. The results showed a significant reduction in the number of female offspring in the pregnancy group compared to the control group ($p= 0.0243$). Male offspring in the lactation group had significantly higher body mass than the control group until the 42nd day of age ($p < 0.05$). The food intake of mothers in the pregnancy group was significantly lower compared to the control ($p= 0.0005$). In behavioral tests, female offspring in the lactation group showed an increase in immobility time ($p= 0.0180$), while male offspring in this group showed higher locomotor activity compared to the control ($p= 0.0041$). Hematological analysis of mothers in the lactation group revealed a significant reduction in RBC ($p= 0.0201$) and a significant increase in MCV ($p= 0.0040$), MCH ($p= 0.0174$), and RDW-CV ($p= 0.0181$). The biochemical analysis revealed that the diet increased glucose levels ($p=0.0177$), total cholesterol ($p=0.0471$), LDL ($p=0.0442$), and HDL ($p=0.0243$) in the lactation group mothers. In the female offspring, changes in the lipid profile were also observed, specifically in total cholesterol ($p=0.0007$), triglycerides ($p=0.0124$), and HDL ($p=0.0164$), with no hepatic toxicity observed. The genotoxicity assay demonstrated an increase in micronuclei in the female offspring of the lactation group compared to the pregnancy group. In conclusion, maternal malnutrition, especially with a high-sucrose diet during pregnancy and lactation, induces changes in body mass, behavioral profile, biochemical, and genotoxic parameters in the offspring. These results emphasize the importance of a balanced maternal nutrition during the gestational and lactational period for offspring health.

Keywords: Behavior;genotoxicity;maternal nutrition;sucrose

Orientador: ANDRESA HEEMANN BETTI

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/286126>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DA ADESÃO AO TRATAMENTO COM TENOFOVIR POR PACIENTES COM HIV EMPREGANDO CONCENTRAÇÕES DO FÁRMACO EM URINA E QUESTIONÁRIOS PADRONIZADOS

Autor: RAFAELA KNAK DOS SANTOS

Abreviatura: SANTOS, R. K.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/07/2023

Resumo: Entre os fármacos utilizados nos esquemas anti-HIV, o tenofovir é amplamente prescrito devido à sua eficácia na obtenção da supressão viral. No entanto, também acarreta risco significativo de nefrotoxicidade, necessitando de monitoramento regular. A adesão à terapia antirretroviral baseada em tenofovir é crucial para o sucesso do tratamento. Vários métodos estão disponíveis para avaliar a adesão, sendo o autorrelato por meio de questionários de adesão a abordagem mais comum. No entanto, o autorrelato é propenso a vieses. Para isso, buscou-se uma maneira de identificar a adesão dos pacientes de forma mais assertiva, não invasiva e simples, que possa ser utilizada no dia a dia dos profissionais de saúde. Neste estudo, empregou-se métodos de quantificação de urina juntamente com questionários de adesão padronizados, como o Morisky-Green e o BMQ (Brief Medication Questionnaire). Dos 72 pacientes que completaram os questionários, 70 forneceram amostras de urina, e destes 88,6% deles tinham carga viral indetectável. Em relação à adesão, 45,7% dos pacientes foram identificados com de alta adesão com base no questionário de Morisky-Green, enquanto 68,6% apresentaram adesão de acordo com o BMQ. Além disso, 73,5% dos pacientes foram categorizados como tendo alta adesão com base na concentração urinária de tenofovir, usando o ponto de corte estabelecido neste estudo (6288,5 ng/mL). Ao comparar os níveis de adesão determinados pelo BMQ e a concentração urinária, observou-se correlação significativa ($p < 0,005$). No entanto, não observamos a mesma relação quando comparamos os níveis de adesão determinados pelo questionário Morisky-Green. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com a importância da adesão ao tratamento, pois comprovam que uma boa adesão garante a supressão viral.

Palavras-Chave: HIV; Adesão; Análise em urina; Tenofovir; Morisky-Green; BMQ

Abstract: Among the therapies used in anti-HIV regimens, tenofovir is widely prescribed due to its effectiveness in achieving viral suppression. However, it also carries a significant risk of nephrotoxicity, necessitating regular monitoring. Adherence to tenofovir-based antiretroviral therapy is crucial for successful treatment. Several methods are available to assess adherence, with self-reporting through adherence questionnaires being the most common approach. However, self-reporting is prone to bias. For this, we sought a way to identify patient adherence in a more assertive, non-invasive and simple way, which can be used in the daily lives of health professionals. In this study, urine quantification methods were used along with standardized adherence questionnaires, such as the Morisky-Green and the BMQ (Brief Medication Questionnaire). Of the 72 patients who completed the questionnaires, 70 provided urine samples, and 88.6% of them had an undetectable viral load. Regarding adherence, 45.7% of the patients were classified as having high adherence based on the Morisky-Green questionnaire, while 68.6% showed adherence according to the BMQ. In addition, 73.5% of patients were categorized as having high adherence based on urinary tenofovir concentration using the cutoff established in this study (6288.5 ng/mL). When comparing the adherence levels determined by the BMQ and the urinary concentration, a significant correlation was observed ($p < 0.005$). However, we did not observe the same relationship when we compared the adherence levels determined by the Morisky-Green questionnaire. The results found in this study corroborate the importance of adherence to treatment, as they prove that good adherence guarantees viral suppression.



Keywords: HIV;Adherence;Urine analysis;Tenofovir;Morisky-Green;BMQ.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/286829>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGUEIRA) EM MODELO *Caenorhabditis elegans* E DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO EM GEL-CREME PARA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO SECO

Autor: LOLITA SCHNEIDER

Abreviatura: SCHNEIDER, L.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/11/2023

Resumo: A *Eugenia uniflora* L é tradicionalmente conhecida no Brasil como “pitanga” ou “pitangueira”, trata-se de uma planta arbórea, frutífera, pertencente à família Myrtaceae. Seu uso tem sido relatado para o tratamento de diversas doenças e suas ações terapêuticas são frequentemente citadas na literatura. O presente estudo teve como objetivo investigar a toxicidade e o potencial efeito antioxidante frente ao estresse oxidativo, utilizando o extrato seco da *Eugenia uniflora*, no modelo alternativo in vivo *C. elegans*. A atividade antioxidante, in vitro, foi determinada pelos métodos de FRAP, nas concentrações de 0,25 a 1,5 mg/mL. Através do ensaio, foi possível verificar um alto poder antioxidante do extrato seco de *E. uniflora*, sendo observado um aumento do poder antioxidante com o aumento da concentração de extrato. Para os ensaios de toxicidade, foram utilizadas concentrações cinco vezes mais elevadas (0,5 a 7,5 mg/mL) que as utilizadas no ensaio FRAP. Houve uma redução significativa na taxa de sobrevivência apenas na concentração de 3,75 mg/mL, apresentando $16,5 \pm 8\%$ de nematoides mortos ($p=0,002$) e concentração de 7,5 mg/mL, apresentando $27 \pm 1,5\%$ de nematoides mortos ($p<0,0001$). Além disso, nessas mesmas concentrações houve uma redução significativa no comprimento corporal dos nematoides ($p<0,05$). Para avaliação do poder antioxidante no modelo *C. elegans*, foram utilizadas as mesmas concentrações testadas no método FRAP, sendo verificado um efeito protetor do extrato seco de *E. uniflora* frente ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, avaliado através do método de DCF-DA. Verificou-se também que o extrato seco de *E. uniflora* aumenta a expressão proteica da enzima superóxido dismutase-3 (SOD-3), avaliado na cepa mutante CF1553. Dessa forma, é possível afirmar que o extrato seco de *Eugenia uniflora* possui uma rica composição de compostos antioxidantes, com baixa toxicidade e com capacidade de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio e atuar na modulação da expressão de enzimas responsáveis pela detoxificação de EROs. Estes fatos encorajaram o estudo para desenvolvimento de formulações tópicas (gel creme) contendo extrato seco de *Eugenia uniflora* para avaliação de seu efeito como antioxidante natural e avaliar a toxicidade desse produto no modelo *C. elegans*. O gelcreme foi desenvolvido por emulsificação e inclusão do gel. Foi incorporado, na base semissólida, o extrato *E. uniflora* correspondendo às concentrações 0,1% do gel-creme. Entretanto, a formulação apresentou estabilidade de apenas 21 dias, sendo necessário realizar alterações na composição do gel-creme para aumentar a estabilidade do produto. Para avaliação toxicológica o gel-creme base (nas concentrações de 0,9375 a 15 mg/mL) e o gel-creme incorporado com extrato seco de *E. uniflora* (nas concentrações de extrato seco de *E. uniflora* de 0,09375 a 1,5 mg/mL), foram avaliados a partir do ensaio de sobrevivência e desenvolvimento. A formulação gel-creme contendo extrato seco de *E. uniflora* 0,1%, apresentou estabilidade durante 21 dias, e pH adequado para uso na pele. Os ensaios de toxicidade demonstraram que ambas as formulações testadas (gel-creme e gel-creme com extrato) não reduziram a sobrevivência dos nematoides ($p>0,05$) e não afetaram o desenvolvimento dos mesmos ($p>0,05$). A avaliação do poder antioxidante da formulação através do método FRAP será avaliada posteriormente, entretanto, resultados anteriores demonstraram que o extrato seco de *E. uniflora* apresenta a capacidade de proteger os nematoides frente ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio. A presença de compostos bioativos no extrato de *E. uniflora*, como os flavonoides, indicam uma fonte de substâncias com pronunciada atividade antioxidante, e a obtenção dessa formulação gel-creme apresenta uma alternativa para aplicações em diferentes ramos, como, por exemplo, da cosmética.



Palavras-Chave: *Eugenia uniflora*; *Caenorhabditis elegans*. Extrato seco, Antioxidante,

Abstract: *Eugenia uniflora* L is traditionally known in Brazil as "pitanga" or "pitangueira", it is an arboreal, fruit-bearing plant belonging to the Myrtaceae family. Its use has been reported for the treatment of several diseases and its therapeutic actions are frequently cited in the literature. The present study aimed to investigate the toxicity and potential antioxidant effect against oxidative extremesis using the dry extract of *Eugenia uniflora*, in the alternative in vivo model *C. elegans*. The antioxidant activity, in vitro, was determined by FRAP methods at concentrations of 0.25 to 1.5 mg/mL. Through the assay it was possible to verify a high antioxidant power of the dry extract of *E. uniflora*, being observed an increase in the antioxidant power with the increase of the extract concentration. For the toxicity tests, concentrations five times higher (0.5 to 7.5 mg/mL) than those used in the FRAP test were used. There was a significant reduction in the survival rate only at the concentration of 3.75 mg/mL, with $16.5 \pm 8\%$ of dead nematodes ($p=0.002$) and a concentration of 7.5 mg/mL, with $27 \pm 1.5\%$ of dead nematodes ($p<0.0001$). In addition, at these same concentrations there was a significant reduction in the body length of the nematodes ($p<0.05$). To evaluate the antioxidant power in the *C. elegans* model, the same concentrations tested in the FRAP method were used, and a protective effect of the dry extract of *E. uniflora* against oxidative stress induced by hydrogen peroxic, evaluated by the DCF-DA method, was verified. It was also found that the dry extract of *E. uniflora* increases the protein expression of the enzyme superoxide dismutase-3 (SOD-3), evaluated in the mutant strain CF1553. Thus, it is possible to affirm that the dry extract of *Eugenia uniflora* has a rich composition of antioxidant compounds, with low toxicity and with the ability to reduce the formation of reactive oxygen species and act in the modulation of the expression of enzymes responsible for the detoxification of ROS. These facts encouraged the development of topical formulations (gel cream) containing dry extract of *Eugenia uniflora* to evaluate its effect as a natural antioxidant in *C. elegans* and to evaluate the toxicity of this product in the *C. elegans* model. The gel-cream was developed by emulsification and inclusion of the gel. The extract *E. uniflora* was incorporated into the semi-solid base, corresponding to 0.1% concentrations of the gel-cream. The gel-cream formulation containing 0.1% *E. uniflora* dry extract was stable for 21 days and had an adequate pH for use on the skin. For toxicological evaluation, the base gel-cream (at concentrations of 0.9375 to 15 mg/mL) and gel-cream incorporated with dry extract of *E. uniflora* (at concentrations of dry extract of *E. uniflora* from 0.09375 to 1.5 mg/mL) were evaluated from the survival and development assay. The toxicity tests showed that both formulations tested (gel-cream and gel-cream with extract) did not reduce the survival of nematodes ($p>0.05$) and did not affect their development ($p>0.05$). The evaluation of the antioxidant power of the formulation through the FRAP method will be evaluated later, however, previous results have shown that the dry extract of *E. uniflora* has the ability to protect nematodes against oxidative stress caused by hydrogen peroxide. The presence of bioactive compounds in *E. uniflora* extract, such as flavonoids, indicate a source of substances with pronounced antioxidant activity, and obtaining this gel-cream formulation presents an alternative for applications in different branches, such as cosmetics.

Keywords: *Eugenia uniflora*; *Caenorhabditis elegans*. Dry extract. Antioxidant.

Orientador: MARIELE FEIFFER CHARAO

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/286838>



Trabalho de Conclusão

Título: AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA E MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Autor: RANIERI REICHEL MARTINI

Abreviatura: MARTINI, R. R.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/03/2023

Resumo: A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica, caracterizada como uma doença proliferativa do sistema hematopoiético, gerando a proteína híbrida BCR-ABL com atividade aumentada de tirosinoquinase. O mesilato de imatinibe (IM), inibidor seletivo da tirosina quinase é considerado terapia de primeira linha para LMC, indicado a pacientes adultos e pediátricos. Apesar da eficácia significativa, há casos de respostas subótimas, falha e efeitos adversos no tratamento com IM, relacionados a fatores genéticos, ambientais, biotransformação, interações com outros medicamentos ou associadas à descontinuidade do tratamento pelo paciente. A manutenção dos níveis plasmáticos do IM próximos ou superiores a 1.000 ng/ml estão relacionados a melhor resposta ao tratamento. O IM é principalmente metabolizado em N-desmetilimatinibe ou norimatinibe (NIM) pela enzima CYP3A4, com menor contribuição de CYP3A5, CYP2C8. O NIM é um metabólito farmacologicamente ativo, com níveis plasmáticos representando 20-25% da concentração no estado estacionário de IM. Esse estudo buscou avaliar a relação entre a farmacogenética e a resposta molecular ao tratamento da LMC com o IM. Para tal, foi realizado um estudo com 49 pacientes adultos com LMC em tratamento com IM, atendidos no serviço de hematologia e oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. Foram obtidas informações sociodemográficas e clínicas dos pacientes, bem como determinadas concentrações do IM, metabólito NIM e razões IM/NIM. Foram também genotipados os CYP3A4, CYP3A5 E CYP2C8 comparando a avaliação de adesão a terapia e resposta molecular. As variantes dos genes foram genotipadas através da reação em cadeia da polimerase em tempo real usando sondas de hidrólise em ensaios de genotipagem TaqMan® SNP alelos CYP3A5 *3, CYP3A4 *22, CYP2C8 *3 e CYP2C8 *4. Os polimorfismos de CYP3A4 e CYP2C8 resultaram em variabilidade plasmática significativa. A mutação CYP 3A4*22 associou-se negativamente com a resposta molecular, como a adesão medicamentosa.

Palavras-Chave: Mesilato de imatinibe; Leucemia mieloide crônica; Farmacogenética; Monitoramento terapêutico; CYP3A4/5; CYP2C8; Norimatinibe; Adesão

Abstract: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a hematological neoplasm, characterized as a proliferative disease of the hematopoietic system, generating the hybrid protein BCR-ABL with increased activity of tyrosine kinase. Imatinib mesylate (IM), a selective tyrosine kinase inhibitor, is considered first-line therapy for CML, indicated for adult and pediatric patients. Despite the significant efficacy, there are cases of suboptimal responses, failure and adverse effects in IM treatment, related to genetic and environmental factors, biotransformation, interactions with other drugs or associated with discontinuation of treatment by the patient. Maintaining IM plasma levels close to or greater than 1,000 ng/ml is related to a better response to treatment. IM is primarily metabolized to N-desmethylimatinib or norimatinib (NIM) by the CYP3A4 enzyme, with a minor contribution from CYP3A5, CYP2C8. NIM is a pharmacologically active metabolite, with plasma levels representing 20-25% of the steady-state concentration of IM. This study sought to evaluate the relationship between pharmacogenetics and the molecular response to the treatment of CML with IM. To this end, a study was carried out with 49 adult patients with CML undergoing IM treatment, treated at the hematology and oncology service of the Hospital de Clínicas in Porto Alegre/RS. Patients' sociodemographic and clinical information was obtained, as well as certain concentrations of IM, NIM metabolite and IM/NIM ratios. CYP3A4, CYP3A5 and CYP2C8 were also genotyped comparing the assessment of adherence to therapy and molecular response. Gene



variants were genotyped by real-time polymerase chain reaction using hydrolysis probes in TaqMan® SNP allele CYP3A5*3, CYP3A4*22, CYP2C8*3, and CYP2C8*4 genotyping assays. CYP3A4 and CYP2C8 polymorphisms resulted in significant plasma variability. The CYP 3A4*22 mutation was negatively associated with molecular response, such as medication adherence.

Keywords: CML; Imatinib mesylate; Dry blood microsamples; Therapeutic monitoring; Pharmacogenetics

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285072>



Trabalho de Conclusão

Título: CONCENTRAÇÕES EM IMPRESSÕES DIGITAIS E SANGUE CAPILAR SECO COMO INDICADORES DE ADESÃO TERAPÊUTICA À CARBAMAZEPINA E ÁCIDO VALPROICO NO TRATAMENTO DA EPILEPSIA

Autor: ISADORA RITTER MULLER

Abreviatura: MULLER, I. R.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/07/2023

Resumo: Indivíduos que realizam tratamento para epilepsia podem ter dificuldade em aderir à terapia. O monitoramento terapêutico (MTF) é geralmente avaliado pela dosagem dos fármacos em amostras de soro/plasma. No entanto, outras opções de amostras têm sido estudadas para quantificação de drogas. O sangue capilar seco (DBS, dried blood spots) têm ganhado interesse na área de monitoramento de drogas terapêuticas devido às suas vantagens potenciais. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de carbamazepina (CBZ) e ácido valproico (AV) em DBS e para CBZ em impressões digitais, correlacionando estas medidas com os níveis séricos e adesão ao tratamento. Os métodos foram validados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS), seguindo os parâmetros de validação da European Medicine Agency. Os dois métodos se mostraram sensíveis e lineares para a detecção dos compostos, com limite de detecção de 0,05 ng digital-1 de CBZ e de 1,0 µg mL⁻¹ de CBZ e 10 µg mL⁻¹ para AV nas amostras de DBS. Os dois métodos se mostraram precisos, com uma variação de 3,29 a 6,75% para a CBZ e 4,67 a 6,54% para o AV na matriz de DBS; e de 3,58 a 7,90% para CBZ em impressões digitais. As duas amostras apresentaram estabilidade de 15 dias em temperatura ambiente e 45°C. Foram coletadas 30 amostras de impressões digitais e 21 amostras de DBS. Todos os participantes responderam questionários de avaliação da adesão ao tratamento. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre as concentrações de CBZ em impressões digitais e os pacientes classificados com baixa adesão pelo Teste de MoriskyGreen. Dois métodos foram validados em LC-MS/MS para a quantificação de dois antiepilépticos em amostras de DBS e impressão digital. As metodologias foram aplicadas em amostras provenientes de pacientes ambulatoriais de um hospital do sul do Brasil.

Palavras-Chave: Carbamazepina;Ácido valproico;Impressões digitais;DBS;LCMS/MS;Monitoramento terapêutico de fármacos.

Abstract: Individuals undergoing treatment for epilepsy may have difficulty adhering to therapy. Therapeutic drug monitoring (TDM) is typically assessed by measuring drug levels in serum/plasma samples. However, alternative sample options have been studied for drug quantification. Dried blood spots (DBS) have gained interest in the field of therapeutic drug monitoring due to their potential advantages. Therefore, this study aimed to develop and validate a methodology for quantifying carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VA) in DBS, as well as CBZ in fingerprints, correlating these measures with serum levels and treatment adherence. The methods were validated using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), following the validation parameters of the European Medicine Agency. Both methods were found to be sensitive and linear for compound detection, with a detection limit of 0.05 ng digital⁻¹ for CBZ and 1.0 µg mL⁻¹ for CBZ, and 10 µg mL⁻¹ for VA in DBS samples. Both methods demonstrated precision, with a variation of 3.29 to 6.75% for CBZ and 4.67 to 6.54% for VA in the DBS sample, and 3.58 to 7.90% for CBZ in fingerprints. Both sample types showed stability for 15 days at room temperature and 45 °C. The fingerprint method was applied to 30 patients using CBZ, while the DBS method was applied to 21 patients using both medications. All participants completed treatment adherence assessment questionnaires. Statistical analysis demonstrated a significant difference between CBZ concentrations in fingerprints and patients classified with low adherence by the Morisky-Green Test. Two LC-MS/MS methods were validated for the quantification of two



antiepileptic drugs in DBS and fingerprint samples. The methodologies were applied to samples from outpatient epileptic patients from Southern Brazil.

Keywords: Carbamazepine; valproic acid; Fingerprints; DBS; LC-MS/MS; Therapeutic drug monitoring.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/286836>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO HIPNÓTICO SEDATIVO E DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOCÁPSULAS CONTENDO O FÁRMACO DIAZEPAM

Autor: JULIA GABRIELE DE JESUS FERREIRA

Abreviatura: FERREIRA, J. G. J.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/03/2023

Resumo: Diazepam, considerado o medicamento mais potente da sua classe, tem como efeito adverso predominante o efeito hipnótico-sedativo, em decorrência do longo tempo de meia vida de eliminação. Dado esse cenário, a nanotecnologia se apresenta como uma ferramenta para melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco, bem como seus efeitos adversos. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo diazepam e avaliar a sua toxicidade aguda e efeito hipnótico-sedativo em camundongos. A fim de quantificar o fármaco a partir das nanocápsulas, foi desenvolvido e validado um método analítico, em Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência em detector de conjunto de fotodiodos (PDA) em 236nm. As nanocápsulas foram produzidas pelo método de nano precipitação e caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação. Estudos de estabilidade de longa duração e estabilidade acelerada também foram realizados. O estudo de liberação in vitro foi realizado em células de difusão de Franz. Neste estudo foram utilizados camundongos isogênicos, Balb C. A avaliação farmacológica foi realizada através do tempo de sono induzido por tiopental e a toxicidade in vivo pela toxicidade aguda. O método mostrou-se seletivo e linear na faixa de trabalho de 0,25 a 4 µg/mL ($r^2=0,9999$). Limites de detecção e quantificação foram de 0,035 e 0,105 µg/mL, respectivamente. A precisão variou de 0,18 a 1,34, enquanto a exatidão, 98,41 a 108,31%. As nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula de $180 \pm 4,0$ nm, índice de polidispersão de $0,119 \pm 0,01$, potencial zeta de $-28,44 \pm 3,3$ mV, pH de $4,05 \pm 0,06$. O teor variou de $97,05 \pm 1,99$ %, e a eficiência de encapsulação encontrada foi de 99,56%. O teste de toxicidade aguda sugere que a formulação mostra-se segura, uma vez que não foram evidenciados sinais de toxicidade através dos parâmetros analisados. No teste de sono induzido por tiopental apenas a dose de 1mg/kg da nanocápsula prolongou a duração do sono. Portanto, a formulação desenvolvida é inédita, possuindo boas características físico-químicas e tecnológicas, e com potencial para reduzir os efeitos adversos oriundos da utilização do diazepam.

Palavras-Chave: Nanotecnologia; Nanotoxicologia; Diazepam; Avaliação in vivo

Abstract: Diazepam, considered the most potent drug in its class, has the hypnotic-sedative effect as its most predominant adverse effect, due to the long elimination half-life. Given this scenario, nanotechnology presents itself as a tool to improve the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of the drug, as well as its adverse effects. Therefore, the objective of this study was to develop and characterize nanocapsules containing diazepam and to evaluate its acute toxicity and hypnoticsedative effect in mice. To quantify the drug from the anocapsules, an analytical method was developed and validated, using an Ultra efficiency Liquid Chromatograph in a photodiode array detector (PDA) at 236nm. The nanocapsules were created through the nanoprecipitation method and characterized in terms of morphology, particle size, polydispersion index, zeta potential, pH, content and encapsulation efficiency. Long-term stability and accelerated stability studies were also performed. The in vitro release study was carried out in Franz diffusion cells. In this study, isogenic mice, Balb C, were used. The pharmacological evaluation was performed through the sleep time induced by thiopental and the in vivo toxicity by the acute toxicity. The method proved to be selective and linear in the working range of 0.25 to 4 µg/mL ($r^2=0.9999$). Limits of detection and quantification were 0.035 and 0.105 µg/mL, respectively. Precision ranged from 0.18 to 1.34, while accuracy 98.41 to 108.31%. The nanocapsules had a



particle size of 180 ± 4.0 nm, polydispersion index of 0.119 ± 0.01 , zeta potential -28.44 ± 3.3 mV and pH 4.05 ± 0.06 . The content ranged from $97.05 \pm 1.99\%$, and the encapsulation efficiency found was 99.56%. The acute toxicity test suggests that the formulation is safe since no signs of toxicity were shown through the analyzed parameters. In the thiopental-induced sleep test, only at a dose of 1mg/kg of the nanocapsule, prolonged sleep duration. Thus, the developed formulation is unprecedented, having good physical-chemical and technological characteristics, and with the potential to reduce the adverse effects arising from the use of diazepam.

Keywords: Nanotechnology; Nanotoxicology; Diazepam; In vivo evaluation

Orientador: ANDRESA HEEMANN BETTI

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285268>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE GEL ANTISSEPTICO COM EFEITO RESIDUAL CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Autor: FERNANDA MENDES DE MORAES

Abreviatura: DE MORAES, FERNANDA MENDES

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 09/03/2023

Resumo: Um dos grandes desafios dos antissépticos é fornecer proteção antimicrobiana por longos períodos sem a necessidade de reaplicação. Nanopartículas de cobre (CuNPs) possuem atividade antimicrobiana por diversos mecanismos, envolvendo a liberação de íons presentes na superfície e interação com a membrana bacteriana. Por atuarem como um “reservatório” de íons metálicos, ocorre uma espécie de liberação gradual, possibilitando ação residual. Buscando explorar esse potencial efeito residual em uma aplicação tópica, este estudo teve por objetivo desenvolver uma formulação em gel à base de polissacarídeos que seja economicamente viável, livre de álcool, com ação antibacteriana imediata e residual. As CuNPs foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Os géis preparados com as CuNPs foram submetidos a análises de centrifugação e os parâmetros de pH, viscosidade, espalhabilidade e tempo de secagem foram determinados. A citotoxicidade foi avaliada em cultura de queratinócitos, visando mimetizar o contato com o epitélio humano, enquanto o potencial antibacteriano imediato e residual foram determinados contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O raio hidrodinâmico encontrado foi de 375 a 530 nm e a CIM foi de 0,31 - 0,62 mg/mL. A CBM (10 mg/mL) foi utilizada na preparação dos géis, que apresentaram coloração avermelhada, característica do cobre e pH entre 4,0 e 6,5. A viscosidade e espalhabilidade obtidas foram compatíveis com a aplicação tópica, e o tempo de secagem variou entre 32 e 65 segundos. A viabilidade celular após a exposição direta dos géis preparados variou entre 31 e 79%, semelhante ao digluconato de clorexidina 1% (antisséptico aprovado para uso) que apresentou viabilidade celular entre 29 e 53%. O perfil de citotoxicidade dos géis foi semelhante na exposição aguda (24h), residual (10 min + 24h de recuperação) e crônica (10 min a cada 24h por 96h), sugerindo um efeito tempo-independente. O potencial antimicrobiano foi determinado pela zona de inibição em ágar, revelando halos de 12 a 15 mm de diâmetro contra os três patógenos.

Além disso, os géis preparados ofereceram uma proteção antibacteriana de pelo menos 60 minutos nas mãos de voluntários, reduzindo as unidades formadoras de colônia em 2 a 3 log₁₀, confirmando o potencial de proteção antibacteriana e a principal aplicação do produto. Esses dados sugerem que os géis preparados fornecem uma melhora acentuada na atividade antibacteriana residual em relação aos produtos à base de etanol.

Palavras-Chave: Haca;Citotoxicidade;Nanopartículas de cobre;Antisseptico

Abstract: One of the great challenges of antiseptics is to provide antimicrobial protection for long periods without the need for reapplication. Copper nanoparticles (CuNPs) exhibit antimicrobial activity by several mechanisms, involving the release of ions present on the surface and interaction with the bacterial membrane. By acting as a “reservoir” of metallic ions, a kind of gradual release occurs, allowing a residual action. Seeking to explore this potential residual effect in a topical application, this study aims to develop a polysaccharide-based gel formulation that is economically viable, alcohol-free, with immediate and residual antibacterial action. CuNPs were characterized in terms of hydrodynamic radius, zeta potential and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The prepared gels were submitted to centrifugation analysis and the parameters of pH, viscosity, spreadability and drying time were determined. Cytotoxicity was evaluated in keratinocytes, aiming to mimic the contact with the human epithelium and the immediate and residual antibacterial potential were



determined against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The hydrodynamic radius found was from 375 to 530 nm and the MIC obtained was from 0.31 - 0.62 mg/mL. The CBM (10 mg/mL) was used in the preparation of gels, which showed a reddish color, characteristic of copper and pH between 4.0 and 6.5. The viscosity and spreadability obtained were compatible with topical application, and the drying time varied between 32 and 65 seconds. Cell viability after direct exposure (1, 3, 10 and 15 minutes) of the prepared gels was between 31 - 79%, similar to 1% chlorhexidine digluconate (antiseptic approved for use), which showed cell viability between 29 - 53%. The cytotoxicity profile of the gels was similar in acute (24h), residual (10 min + 24h) and chronic exposure (10 min every 24h for 96h), suggesting a timeindependent effect. The antibacterial potential revealed inhibition zones from 12 to 15 mm in diameter against the three pathogens. Furthermore, the prepared gels offered antibacterial protection for at least 60 minutes on the hands of volunteers, reducing colony forming units by 2 - 3 log₁₀. These data suggest that the prepared gels can provide marked improvement in the residual antibacterial activity over ethanol-based products.

Keywords: Hacat;Cytotoxicity;Copper Nanoparticles;Antiseptic

Orientador: ANA LUIZA ZIULKOSKI

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/284943>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BIOANALÍTICAS PARA A PERSONALIZAÇÃO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DE TUMORES GASTROINTESTINAIS

Autor: LAURA CE DA SILVA

Abreviatura: SILVA, L. C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 30/03/2023

Resumo: A quimioterapia é uma estratégia empregada na maior parte dos casos câncer, mas sua eficácia vem sendo comprometida pelos mecanismos de resistência tumoral. O 5-Fluorouracil (5-FU) é a principal droga citotóxica utilizada para o tratamento de tumores sólidos, especialmente os gastrointestinais. Este quimioterápico possui um intervalo terapêutico estreito e está associado a toxicidade grave e ampla variabilidade inter-individual. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar estratégias bioanalíticas para individualização da farmacoterapia, ampliando a eficácia e reduzindo efeitos tóxicos. Testes de fenotipagem, como a quantificação de uracil (U) e dihidrouracil (UH2) e a genotipagem são fundamentais para identificação de pacientes em risco de desenvolver toxicidade associada ao 5-FU. Um método capaz de quantificar U, UH2 e 5-FU em plasma utilizando Uracil- $^{13}\text{C}^1\text{N}$ e Dihidrouracil- $^{13}\text{C}^1\text{N}$ como analitos substitutos foi desenvolvido e validado. O método possui alta sensibilidade, é seletivo, preciso e exato. Amostras coletadas de 20 pacientes apresentaram concentrações entre 6,9 e 22,4 ng/mL para U, 122,8 e 1.203,5 ng/mL para 5-FU e 4,3 e 17,5 para a taxa metabólica UH2/U. O monitoramento terapêutico das concentrações de 5-FU também é relevante, mas incomum na rotina clínica. Tendo em vista as vantagens intrínsecas das microamostras, desenvolveu-se um método para a detecção de 5-FU em manchas de sangue seco em papel (dried blood spots, DBS) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. O método foi linear no intervalo de 100 a 2.000 ng/mL, com recuperação média de 70% e ausência de impactos significativos associados ao hematócrito. Um total de 40 amostras pareadas de DBS capilar, DBS venoso e plasma foram incluídas. Apesar das concentrações capilares e plasmáticas estarem correlacionadas ($r > 0,90$), não houve concordância entre os métodos, com níveis capilares equivalentes a 146% do plasma. O DBS venoso correspondeu a 110% do plasma, com forte correlação ($r > 0,97$) e concordância entre métodos. Ainda no âmbito da oncologia de precisão, o ChemoBiogram®, desenvolvido pela Ziel Biosciences, é um ensaio de quimiorresistência in vitro para avaliar a resposta tumoral frente aos quimioterápicos antes do início do tratamento. Neste trabalho buscou-se validar um protocolo para dissociação de tumores colorretais visando a obtenção de células para realização do teste. A técnica foi desenvolvida com base em estudos prévios e quatro amostras de tecido tumoral fresco foram processadas. A validação deste protocolo foi limitada devido a dificuldades enfrentadas na manutenção dos cultivos celulares.

Palavras-Chave: 5-fluorouracil;dried blood spots;UHPLC-MS/MS;uracil;quimiorresistência.

Abstract: Chemotherapy is a strategy used in most cancer cases, but its effectiveness has been compromised by tumor resistance mechanisms. 5-Fluorouracil (5-FU) is the main cytotoxic drug used for the treatment of solid tumors, especially gastrointestinal ones. This drug has a narrow therapeutic window and is associated with severe toxicity and large inter-individual variability. In this context, the present study aimed to develop and validate bioanalytical strategies for individualizing pharmacotherapy, increasing its efficacy and reducing toxic effects. Phenotyping tests, such as uracil (U) and dihydrouracil (UH2) quantification and genotyping are essential for identifying patients at risk of developing 5-FU-associated toxicity. A method for simultaneous quantification of U, UH2 and 5-FU in plasma using Uracil- $^{13}\text{C}^1\text{N}$ and Dihidrouracil- $^{13}\text{C}^1\text{N}$ as substitute analytes was developed and validated. The method has high sensitivity and is selective, precise, and accurate. Samples collected from 20 patients showed concentrations between 6.9 and 22.4 ng/mL for U, 122.8 and 1,203.5 ng/mL for 5-FU and 4.3 and 17.5 for the UH2/U metabolic ratio. Therapeutic monitoring



of 5-FU concentrations is also relevant, but uncommon in clinical practice. In view of the intrinsic advantages of microsamples, a method was developed for the detection of 5-FU in dried blood spots (DBS) using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The method was linear in the range of 100 to 2,000 ng/mL, with an average recovery of 70% and no significant impact associated with hematocrit. A total of 40 paired samples of capillary DBS, venous DBS and plasma were included. Although capillary and plasma concentrations were correlated ($r > 0.90$), there was a lack of agreement between the methods, with capillary levels equivalent to 146% of the plasma. Venous DBS represented 110% of the plasma, with a strong correlation ($r > 0.97$) and agreement between the methods. Focusing on personalized medicine, the ChemoBiogram® kit, developed by Ziel Biosciences, is an in vitro chemoresistance test to assess the tumor response to chemotherapy before treatment. This study aimed to validate a protocol for the dissociation of colorectal tumor samples to obtain viable cells to perform the test. The technique was developed based on previous studies, and four samples of fresh tumor tissue were processed. The validation was limited because of the difficulties in maintaining cell cultures.

Keywords: chemoresistance;5-fluorouracil;dried blood spots;UHPLC-MS/MS;uracil.

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285079>



Trabalho de Conclusão

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MÚLTIPLAS DROGAS DE ABUSO EM SANGUE EMPREGANDO DISPOSITIVOS DE MICROAMOSTRAGEM.

Autor: MARIANA SMIDT

Abreviatura: SMIDT, M.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 29/06/2023

Resumo: Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas para avaliar a exposição humana às drogas. Dentre estas, o sangue se destaca por apresentar melhor relação com os efeitos sobre o desempenho humano e com os efeitos tóxicos. As microamostras trazem muitas vantagens para a quantificação de drogas de abuso, a coleta minimamente invasiva e a estabilização dos analitos, no caso de emprego de amostras secas. Recentemente, novas alternativas para microamostragem de sangue se tornaram disponíveis, como é o caso do dispositivo hemaPEN®. Desse modo, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação analítica de estratégias de microamostragem para detecção de múltiplas drogas de abuso, tanto em sangue seco (DBS) obtido com o dispositivo hemaPEN®, como em plasma líquido obtido com o dispositivo Tasso, empregando cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) como método de análise. O método empregando DBS obtido com o dispositivo hemaPEN® determinou cocaína e seus metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno. A exatidão do QCLLOQ foi de 112,7-118,0%. A precisão intra e interensaio no nível QCLLOQ ficou entre 3,6 – 18,2% e 3,6 - 10,8% respectivamente. O método apresentou efeito de matriz com faixa entre -0,42 e 9,75%. Os critérios adicionais de validação bioanalíticos foram atendidos. O método para determinação de codeína, 6-acetilmorfina, anfetamina, MDA, metanfetamina, MDMA, MDEA, benzoilecgonina, heroína, cocaína, norcocaína, cocaetileno e PCP em plasma obtido com o dispositivo Tasso apresentou exatidão entre 99,0% e 112,4%. A precisão intra e interensaio em controles com concentrações baixas, médias e altas foi de 3,47-6,17, 3,64-6,60 e 1,97-4,50% e 3,15-6,20, 5, 63-8,23 e 3,50-6,57%, respectivamente. O efeito matriz ficou entre -4,25% e 13,45%. O uso do hemaPEN®, que retém o sangue seco dentro do dispositivo, pode ser vantajoso para a determinação de drogas de abuso no sangue capilar quando comparado à coleta DBS convencional. Um ensaio microQuEChERS-LC-MS/MS eficiente e sensível para a determinação de marcadores de uso de drogas ilícitas em microamostras de plasma foi desenvolvido e validado. As metodologias foram aplicadas em amostras provenientes de pacientes internados em uma clínica de reabilitação que relataram terem feito uso de drogas de abuso.

Palavras-Chave: Drogas de abuso;microQuEChERS;hemaPEN®;Tasso-SST;UHPLCMS/MS

Abstract: Several biological matrices can be used to assess human exposure to drugs. Among these, blood+ stands out for its better correlation with the effects on human performance and toxic effects. Microsampling offers numerous advantages for quantifying drugs of abuse, including minimally invasive collection and analyte stabilization when using dry samples. Recently, new options for blood microsampling have become available, such as the hemaPEN® device. Therefore, this study aimed to develop and validate microsampling strategies for detecting multiple drugs of abuse, both in dried blood spots (DBS) obtained with the hemaPEN® device and in liquid plasma obtained with the Tasso device, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) for analysis. The method utilizing DBS focused in the determination of cocaine and its metabolites benzoylecgonine and cocaethylene. The assay exhibited an accuracy of 112.7-118.0%. Intra and inter-assay precision at the QCLLOQ level was between 3.6 18.2% and 3.6 - 10.8% respectively. The method showed a matrix effect with a range between -0.42 and 9.75%. Additionally, the method met other bioanalytical validation criteria. The method for determining codeine, 6acetylmorphine, amphetamine, MDA, methamphetamine, MDMA, MDEA, benzoylecgonine, heroin, cocaine, norcocaine, cocaethylene, and PCP in plasma obtained with the Tasso device demonstrated accuracy between 99.0% and 112.4%. The intra- and inter-assay precision



at the low, medium, and high concentration quality controls was 3.476.17%, 3.64-6.60%, and 1.97-4.50%, and 3.15-6.20%, 5.63-8.23%, and 3.50-6.57%, respectively. The matrix effect ranged from -4.25% to 13.45%. The use of hemaPEN®, which retains DBS inside the device, can be advantageous for determining drugs of abuse in capillary blood compared to conventional DBS collection. In addition, an efficient and sensitive microQueChERS-LC-MS/MS assay for determining markers of illicit drug use in plasma microsamples was developed and validated. The methodologies were applied to samples from patients admitted to a rehabilitation clinic who reported having used drugs of abuse.

Keywords: Drugs of abuse;microQueChERS;HemaPEN®;Tasso-SST;UHPLC-MS/MS

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285969>



Trabalho de Conclusão

Título: DETERMINAÇÃO DE DROGAS E METABÓLITOS DE INTERESSE FORENSE EM URINA EMPREGANDO TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ASSOCIADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Autor: ANELISE SCHNEIDER

Abreviatura: SCHNEIDER, ANELISE

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 19/06/2023

Resumo: A matriz biológica mais utilizada para a monitoramento do uso recente de drogas de abuso e fármacos é a urina. A determinação simultânea e sensível dos múltiplos compostos alvo em controle de drogas em local de trabalho em urina é um significativo desafio analítico, devido às baixas concentrações presentes, a ocorrência de efeitos de matriz e a diversidade de propriedades físico-químicas dos analitos. Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos multianalitos para determinação de drogas e metabólitos em urina, um que consiste na simples diluição da amostra e outro baseado em microextração de fase sólida biocompatível (BioSPME). Ambos foram validados para a determinação simultânea de anfetaminas, opioides, metabólitos da cocaína e carbóxi-THC (THC-COOH) utilizando análise por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). No método com preparação por diluição da amostra, a precisão intra-ensaios foi 2,7-8,1% e a precisão inter-ensaios foi 2,8-10,2% e a exatidão foi de 93,9 a 110,1%. Os valores de rendimento de extração no método diluição foram de 88,8 a 104,3% e o efeito matriz foi de 0,31 a 15,5%. No método empregando preparação de amostra por BioSPME, a precisão intra-dias foi 1,2-3,5% e a inter-dias foi 2,03-10,8%. A exatidão foi de 94,5 a 107,4%. O rendimento de extração foi de 90,7 a 109,4, exceto para o MDA, que teve resultado de 74,9% para o controle baixo e 85% para o controle alto e para o THC-COOH com resultados de 62,8 e 63 % para os controles baixo e alto, respectivamente. O efeito matriz variou de -3,98 a 1%. Para os dois métodos foram aplicadas amostras de 16 pacientes potencialmente expostos aos compostos de interesse. Ambos os métodos podem ser utilizados para o monitoramento de drogas de abuso no ambiente de trabalho. O método baseado em BioSPME é o primeiro a determinar um amplo conjunto de marcadores de exposição a drogas de abuso em urina.

Palavras-Chave: Urina; drogas de abuso; ambiente de trabalho; microextração; SPME biocompatível; LC-MS/MS

Abstract: The most used biological matrix for monitoring the recent use of drugs of abuse and pharmaceuticals is urine. The simultaneous and sensitive determination of multiple target compounds in workplace drug control in urine is a significant analytical challenge due to the low concentrations present, the occurrence of matrix effects and the diversity of physicochemical properties of the analytes. In this work, two multianalyte methods were developed for the determination of drugs and metabolites in urine, one consisting of simple sample dilution and the other based on biocompatible solid phase microextraction (BioSPME). Both were validated for the simultaneous determination of amphetamines, opioids, cocaine metabolites and carboxyTHC (THCCOOH) using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. In the sample dilution preparation method, the within-assay precision was 2.7-8.1% and the inter-assay precision was 2.8-10.2% and the accuracy was 93.9-110.1 %. The extraction yield in the dilution method ranged from 88.8 to 104.3%, and the matrix effect ranged from 0.31 to 15.5%. In the method employing sample preparation by BioSPME, the intra-day precision was 1.2-3.5% and the inter-day precision was 2.-10.8%. Accuracy ranged from 94.5 to 107.4%. The extraction yield ranged from 90.7 to 109.4%, except for MDA, which had 74.9% for the low control and 85% for the high control and for THC-COOH with results of 62.8 and 64% for low and high controls, respectively. The matrix effect ranged from -3.98 to 1%. For both methods, samples of 16 patients potentially exposed to the compounds of interest were analyzed. Both methods can be used to monitor drug abuse in the workplace. The BioSPME-based method is the first to determine a broad set of markers of drug exposure in the urine.



Keywords: Urine;drugs of abuse;workplace;microextraction;biocompatible SPME;LC-MS/MS

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285913>



Trabalho de Conclusão

Título: MONITORAMENTO DA FARMACOTERAPIA COM TOPIRAMATO EMPREGANDO MICROAMOSTRAS PLASMA CAPILAR SECO: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA QUÍMICA

Autor: ISABELA RITTER OTT

Abreviatura: OTT, I. R.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/07/2023

Resumo: O topiramato (TPM), anticonvulsivante de segunda geração não benzodiazepínico, apresenta potencial para o tratamento de dependência química ao álcool e outras drogas. O emprego de manchas de sangue seco (DBS) tem sido proposto com a finalidade de monitorar o tratamento farmacológico de diversas classes de medicamentos. Contudo, visto as diferenças na partição sangue e plasma do TPM, esta estratégia de amostragem alternativa mostra-se limitada. Já as amostras de plasma seco (DPS) possuem as mesmas vantagens logísticas das amostras de DBS, porém sem a limitação relacionada a relação entre plasma e sangue. Desta forma, o presente estudo propõe o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo (CG-DNF) para monitorar a farmacoterapia com TPM em microamostras secas de plasma capilar colhido em dispositivo HealthID® plasma separation device (PSD). A técnica de extração da amostra possibilitou a análise de cloretos estimando a quantidade de plasma na mancha e a análise do TPM. A extração realizou-se com 3 discos de 6 mm de DPS adicionando tampão de extração pH 9,0, e em seguida a análise dos cloretos conduziu-se conforme orientações do fabricante. Seguiu-se com a adição de padrão interno MPPH, tampão Tris pH 10 e solvente MTBE e por fim o extrato seco foi ressuspensão com solução derivatizante TMAH 0,07M. Analisaram-se os níveis de fosfatidiletanol (PEth), metabólito de consumo crônico de álcool. Aplicou-se o CG-DNF no modo de injeção splitless e a separação cromatográfica com coluna NA-1 em rampa de temperatura de 170 a 270 °C. O tempo de corrida foi de 15 minutos. Os resultados obtidos demonstraram-se satisfatórios, com curvas lineares para ajuste ponderal 1/x. A exatidão foi de 98,1 a 107,7% e as precisões intra e interensaios de, respectivamente, 3,62 a 8,29% e 4,18 a 6,99%, a amostra foi estável por 21 dias em todas temperaturas testadas. O rendimento médio da extração foi de 53%. O uso do CG-DNF permitiu a análise eficaz de baixas concentrações em pequenos volumes de amostra. Para aplicação clínica, coletaram-se 11 amostras pareadas de plasma 7 capilar seco em dispositivo HealthID® e de plasma obtido de dependentes químicos em tratamento com o TPM, atendidos em centros de saúde de Campo Bom. As concentrações corrigidas pelo cloreto nas amostras de DPS tiveram uma alta correlação ($r_s=0,96$) e representaram em média 102% das medidas em plasma. Dois pacientes tiveram níveis quantificáveis de PEth. Foi desenvolvido e validado um método para análise de TPM em CG-DNF.

Palavras-Chave: Topiramato; plasma seco em papel; cromatografia a gás; etanol; dependência química; adesão

Abstract: Topiramate (TPM), a second-generation non-benzodiazepine anticonvulsant, has potential for the treatment of chemical dependence on alcohol and other drugs. The use of dried blood spots (DBS) has been proposed in order to monitor the pharmacological treatment of different classes of drugs. However, given the differences in the TPM blood and plasma partition, this alternative sampling strategy is limited for the drug. On the other hand, dried plasma spots (DPS) have the same logistical advantages as DBS samples, without the limitation related to the relationship between plasma and blood. Thus, the present study proposes the development and validation of an analytical methodology by gas chromatography with nitrogen and phosphorus detector (GC-NPD) to monitor pharmacotherapy with TPM in dry microsamples of capillary plasma collected in a HealthID® plasma separation device. (PSD). The sample extraction technique allowed the analysis of chlorides by estimating the amount of plasma in the stain and the TPM analysis. The



extraction was carried out with 3 discs of 6 mm of DPS adding pH 9.0 extraction buffer, and then the analysis of the chlorides was carried out according to the manufacturer's instructions. This was followed by the addition of MPPH internal standard, Tris pH 10 buffer and MTBE solvent and finally the dry extract was resuspended with 0.07M TMAH derivatizing solution. The levels of phosphatidylethanol (PEth), a metabolite of chronic alcohol consumption, were analyzed. GC-DNF was used in splitless injection mode and chromatographic separation with NA1 column in temperature ramp from 170 to 270 oC. The running time was 15 minutes. The results obtained were satisfactory, with linear curves for weight adjustment 1/x. Accuracy ranged from 98.1 to 107.7% and intra and interassay precisions from, respectively, 3.62 to 8.29% and 4.18 to 6.99%, the sample was stable for 14 days at room temperature . The average extraction yield was 53%. The use of GC-DNF allowed the effective analysis of low concentrations in small sample volumes. For clinical application, 11 paired samples of capillary plasma dried in a HealthID® device and plasma obtained by venipuncture were collected from 9 chemical dependents undergoing treatment with TPM, attended at health centers in Campo Bom. The chloridecorrected concentrations in the DPS samples were highly correlated ($r_s=0.96$) and represented on average 102% of the plasma measurements. Two patients had quantifiable levels of PEth. A method for analysis of TPM in GC-DNF was developed and validated.

Keywords: Topiramate;paper-dried plasma;gas chromatography;ethanol;chemical dependency;adhesion

Orientador: MARINA VENZON ANTUNES

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/286880>



Trabalho de Conclusão

Título: MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE MEROPENEM EMPREGANDO MICROAMOSTRAS DE PLASMA E SANGUE SECO EM PAPEL OBTIDAS APARTIR DE PUNÇÕES CAPILARES

Autor: MARIA AMELIA DE CASTILHOS BUSATO

Abreviatura: BUSATO, M. A. C.

Tipo do Trabalho: DISSERTAÇÃO

Data da Defesa: 31/03/2023

Resumo: O meropenem é um antimicrobiano caracterizado como bactericida, utilizando especialmente em infecções graves, particularmente em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI). O parâmetro farmacodinâmico/farmacocinético (PK/PD) melhor correlacionado com eficácia dos carbapenêmicos é a fração do tempo em que a concentração do fármaco permanece acima da concentração inibitória mínima (MIC), que deve ser superior a 100%. Nesta dissertação, foram desenvolvidos e validados dois ensaios para a quantificação de meropenem por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), empregando microamostras de plasma e de sangue seco em papel (dried blood spots, DBS). As fases móveis foram compostas de água e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Acquity C8 (100 x 2,1 mm, d.p. 1,7 μ m). O tempo de corrida cromatográfica foi de 7,5 min, com retenção em 3,48 min para o meropenem e 4,27 mins para o padrão interno (PI) ciprofloxacino-d8. O método foi linear para os intervalos de 0,5 a 50 μ g/mL e não foram identificados interferentes em amostras brancas. O efeito matriz em ambas as amostras foi compensado adequadamente pelo PI. Nas amostras de plasma a precisão inter-ensaio e intra-ensaio variou de 3,8 a 7,9% e de 2,7 a 5,5%, respectivamente, enquanto a exatidão apresentou valores entre 91,7 e 100,6%. O rendimento de extração (RE) em amostras de plasma foi 87,0-92,4 %. Em amostras de DBS, a precisão inter-ensaio e intraensaio variaram de 5,2 a 12,9 % e de 6,4 a 12,5%, respectivamente, enquanto a exatidão apresentou valores entre 97,4 e 105,6 %. O rendimento de extração foi 73,8-75%. O hematócrito teve efeito limitado sobre a exatidão e a eficiência da extração. O ensaio foi aplicado em 15 amostras clínicas de plasma venoso e capilar e em 5 amostras de DBS. As concentrações em plasma venoso e capilar foram altamente correlacionadas, assim como as concentrações em plasma venoso e DBS. Estudos complementares incluindo um número maior de pacientes são necessários para avaliar a possibilidade de uso das matrizes alternativas para a determinação de meropenem em situações clínicas.

Palavras-Chave: Meropenem; monitoramento terapêutico de fármacos; UTI; microamostras de plasma; DBS; LCMS/MS.

Abstract: Meropenem is a bactericidal antimicrobial drug, used especially in severe infections, particularly in hospitalized patients in intensive care units (ICUs). The pharmacodynamic/pharmacokinetic (PK/PD) parameter most correlated with the efficacy of carbapenems is the fraction of time during which the drug concentration remains above the minimum inhibitory concentration (MIC), which should be greater than 100%. In this dissertation, two assays were developed and validated for the quantification of meropenem by liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS/MS), using microsamples of plasma and dried blood spots (DBS). The mobile phases were composed of water and acetonitrile with 0.1% formic acid. Chromatographic separation was performed with an Acquity C8 column (100 x 2.1 mm, d.p. 1.7 μ m). The chromatographic run time was 7.5 min, with retention at 3.48 min for meropenem and 4.27 min for the internal standard (IS) ciprofloxacin-d8. The method was linear in the ranges of 0.5 to 50 μ g/mL and no interferents were identified in blank samples. The matrix effect in both matrices was adequately compensated for by the IS. In plasma samples, inter-assay and intra-assay precision ranged from 3.8 to 7.9% and 2.7 to 5.5%, respectively, while accuracy values ranged from 91.7 to 100.6%. The extraction yield (EY) in plasma samples was 87.0-92.4%. In DBS samples, inter-assay and intra-assay precision ranged from 5.2 to 12.9% and 6.4 to 12.5%, respectively, while accuracy values ranged from 97.4 to 105.6%. The extraction yield was 73.8-75%. Hematocrit had a limited effect on accuracy and extraction



efficiency. The assay was applied to 15 clinical samples of venous and capillary plasma and 5 DBS samples. The concentrations in venous and capillary plasma were highly correlated, as were the concentrations in venous plasma and DBS. Further studies, including a larger number of patients, are necessary to evaluate the possibility of using the evaluated alternative matrices for the determination of meropenem in clinical settings.

Keywords: Meropenem;therapeutic drug monitoring;ICU;plasma microsamples;DBS;LCMS/MS.

Orientador: RAFAEL LINDEN

Acesso ao documento: <https://pergamum.feevale.br/acervo/285226>

