

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DO ITEM DE
TESTE “DEGESAN” PELO MÉTODO DE BCOP (*BOVINE CORNEAL
OPACITY AND PERMEABILITY TEST*)**

Relatório Final nº S-0003-084610-01-B

INSTALAÇÃO DE TESTE: IT INVITROCELL – Invitrocell Avaliação Molecular e Celular Ltda.
Av. Prof. Benedito Montenegro, 240 - Betel, Paulínia / SP, Brasil CEP: 13148-189
Telefone: +55 (19) 3749-8309
E-mail: bcm@grupoinvestiga.com.br
Home Page: www.invitrocell.com.br

PATROCINADOR: Extrato Flora Ind e Com de Correlatos Cosm. Epis. e Sanean. Ltda
Rua Luiz Nallin,403 - Bloco A, Vila Cosmos - Cosmópolis – SP
Telefone: +55 (19) 3872-3033
E-mail: ingrid@extratoflora.com - INGRID ROSANA SCHWARZ

Versão 01

24 de Julho de 2020

PESSOAL RESPONSÁVEL

PATROCINADOR

Nome: Extrato Flora Ind e Com de Correlatos Cosm. Epis. e Sanean. Ltda
Endereço: Rua Luiz Nallin,403 - Bloco A, Vila Cosmos - Cosmópolis – SP
Telefone: +55 (19) 3872-3033
E-mail de contato: ingrid@extratoflora.com - Ingrid Rosana Schwarz

DIRETOR DE ESTUDO (DE)

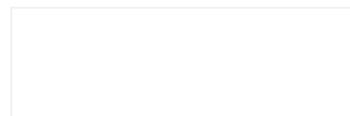
Nome: Jéssica Natalia Azevedo
Endereço: Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240 - Betel, Paulínia / SP, Brasil
CEP: 13148-189
Telefone: +55 (19) 3749-8309
E-mail de contato: Jessica.azevedo@grupoinvestiga.com.br

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratórios (BPL), em conformidade com a NIT-DICLA-035/Cgcre.

Todos os documentos referentes ao presente estudo, dados brutos, plano de estudo e cópia do relatório final, assim como Item de teste e sistema teste, encontram-se à disposição do patrocinador na IT Invitrocell, Invitrocell Avaliação Molecular e Celular Ltda., localizada na Av. Prof. Benedito Montenegro, 240, Betel, Paulínia/SP.

DIRETOR (A) DE ESTUDO



Nome: Jéssica Natalia Azevedo

Endereço: Av. Prof. Benedito Montenegro, 240 - Betel, _____
Paulínia / SP, Brasil CEP: 13148-189

Telefone: +55 (19) 3749-8309

E-mail: jessica.azevedo@invitrocell.com.br

24/07/2020

EQUIPE IT INVITROCELL	
Nome	Função
Rodrigo Vieira Rodrigues	Gerente da Instalação Teste
Keiti Oliveira da Silva	Garantia da Qualidade
Jessica Natalia Azevedo	Diretor (a) de Estudo
Luan Sergio Teodoro Ribeiro e Jéssica Natalia Azevedo	Arquivista

DECLARAÇÃO DA GARANTIA DA QUALIDADE

Este relatório final, nº S-0003-084610-01-B, foi inspecionado e revisado pela Garantia da Qualidade da IT INVITROCELL, localizada à Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240, Betel, Paulínia/SP, sendo avaliados sua clareza, conteúdo e, que ele reflete os dados brutos.

Também foram avaliadas suas fases críticas (FC): Inspeção por processo, nas datas listadas abaixo, e informadas ao GIT e DE.

Eu, Keiti Oliveira da Silva, como representante da garantia da qualidade da IT INVITROCELL declaro que todas estas medidas garantem a aderência do estudo aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório como estabelecido pela NIT-DICLA-035/Cgcre.

Inspeções de Estudo				
Fase Crítica	Data de Inspeção	Data de Relato	Pessoal Informado	Identificação da Inspeção
Plano de Estudo	18/06/2020	18/06/2020	Rodrigo Vieira Rodrigues (GIT)	PLANO-EST-BPL-0115
			Jessica Natalia Azevedo (DE)	
Inspeção por processo	10/06/2020	15/06/2020	Rodrigo Vieira Rodrigues (GIT)	INSP_ES-0078
	23/01/2020	24/01/2020	Jessica Natalia Azevedo (DE)	INSP_ES-0066
	16/01/2020	17/01/2020	Jessica Natalia Azevedo (DE)	INSP_ES-0064
Relatório Final	22/07/2020	22/07/2020	Rodrigo Vieira Rodrigues (GIT)	REL-BPL-0183
			Jessica Natalia Azevedo (DE)	

REPRESENTANTE DA GARANTIA DA QUALIDADE

Nome: Keiti Oliveira da Silva

Endereço: Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240 - Betel, _____
Paulínia / SP, Brasil CEP: 13148-189

Telefone: +55 (19) 3749-8309

E-mail: keiti.silva@grupoinvestiga.com.br

24/07/2020

RESUMO

O ensaio de BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*) é um método *in vitro* utilizado para identificar substâncias químicas que potencialmente induzem irritação ocular severa ou substâncias que não requerem classificação para irritação ocular (Categoria 1 ou Sem Categoria, segundo estabelecido pela UN GHS). Neste método a córnea bovina é utilizada como sistema teste, pois preserva a curto prazo as funções fisiológicas e bioquímicas normais do tecido vivo. No presente estudo, o item de teste “*DEGESAN*” foi avaliado quanto aos danos físicos causados à córnea como opacidade e aumento da permeabilidade através da membrana. O item de teste foi aplicado puro sobre a córnea por 10 minutos. Após este período, as córneas foram lavadas pelo menos três vezes (ou até não ser observado substância sobre a córnea) com meio EMEM para remover o item de teste e as córneas foram incubadas com EMEM por 2 horas. A medida de opacidade foi realizada com o auxílio de um opacitômetro (OP-KIT). Para medir a permeabilidade, as córneas foram incubadas com solução de fluoresceína por 1,5 horas e a quantidade de fluoresceína que permeou a córnea foi mensurada com um espectrofotômetro. A média dos valores de opacidade e de permeabilidade foram utilizados para calcular o índice de irritação *in vitro* (IVIS – “*In Vitro Irritancy Score*”), onde o modelo preditivo indica que substâncias que apresentam um IVIS inferior ou igual à 3 não necessitam de rotulagem de perigo ocular (Sem categoria) e substâncias com IVIS maior que 55 são classificadas como categoria 1 (Corrosivas). Como item de controle negativo e positivo do ensaio foram utilizados a solução salina NaCl 0,9% e o etanol respectivamente. Para o item de controle negativo NaCl 0,9% não foi observada opacidade ou aumento da permeabilidade da córnea, sendo classificado como “Sem Categoria”. O item de controle positivo etanol ocasionou opacidade e aumento da permeabilidade da córnea, sendo categorizados como “Nenhuma previsão independente pode ser feita” e o item de teste “*DEGESAN*” não ocasionou opacidade e aumento da permeabilidade da córnea, sendo categorizados como “Sem Categoria”, em acordo com o preconizado no guia OECD 437.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVO	8
3. DEFINIÇÕES E SIGLAS	8
4. DATAS	9
5. ITENS DO ENSAIO	10
5.1. Item de teste	10
5.2. Item de controle positivo	10
5.3. Item de controle negativo	10
5.4. Sistema Teste (ST)	10
6. MATERIAL E MÉTODOS	10
6.1. Materiais, reagentes e equipamentos	11
6.2. Referência Guias Oficiais de Teste ou Outros Métodos Utilizados	11
6.3. Delineamento experimental do estudo	11
6.3.1. Preparo do Sistema Teste (ST)	11
6.4.1. Preparo e aplicação do Item de teste	12
6.4.2. Preparo e aplicação do item de controle positivo	12
6.4.3. Preparo e aplicação do item de controle negativo	12
6.4.4. Procedimentos do ensaio	12
6.4.5. Cálculo do Índice de Irritação <i>in vitro</i> (IVIS)	13
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
8. CONCLUSÃO	16
9. ARMAZENAMENTO E RETENÇÃO DE REGISTROS E MATERIAIS	17
9.1. Registros	17
9.3. Itens de Teste/Referência	17
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
11. ANEXOS	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Câmara de teste utilizada no teste de Permeabilidade à Opacidade da Córnea Bovina (BCOP).....	12
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de classificação da amostra segundo o grau de irritação ocular (IVIS) de acordo com OECD TG437 (2017).....	13
Tabela 2. Valores máximo e mínimos de IVIS histórico para o item de controle positivo (Etanol).....	14
Tabela 3. Valores médios de opacidade.....	15
Tabela 4. Valores médios de permeabilidade (OD_{490}).....	15
Tabela 5. Classificação das amostras segundo o potencial de irritação in vitro (IVIS).....	15
Tabela 6. Valores brutos de opacidade.....	18
Tabela 7. Valores brutos de permeabilidade (absorbância da fluoresceína - OD 490nm).....	18

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (“*Bovine Corneal Opacity and Permeability*” - BCOP) é um método *in vitro* que pode ser utilizado para identificar substâncias químicas potencialmente indutoras de irritação ocular severa bem como àquelas substâncias químicas que não requerem classificação quanto a segurança de irritação ocular, conforme estabelecido pelas Nações Unidas (UN – *United Nations*) do sistema de harmonização global para classificação e rotulagem de substâncias químicas (*Globally Harmonized System for classification and labelling of chemicals* – GHS). O método apenas permite classificar substâncias como “corrosivos oculares e irritantes severos” (Categoria 1) ou como não irritantes oculares (Sem categoria), conforme definido pela UN GHS.

O ensaio baseia-se na avaliação de dois eventos envolvidos na irritação ocular: 1) Opacidade; e 2) Permeabilidade da córnea. Estes eventos são analisados por meio da determinação da transmissão da luz através da córnea (opacidade) e pela permeação do corante fluoresceína através da córnea (permeabilidade).

A opacidade é resultante do processo de desnaturação das proteínas do tecido vivo, enquanto que a permeabilidade está associada a morte celular e ao afrouxamento das junções célula-célula do tecido.

Para substâncias químicas que se enquadram na Categoria 1 (UN GHS), o método de BCOP apresenta uma acurácia de 79% (150/191), com uma proporção de 25% de falsos-positivos (32/126) e 14% de falsos-negativos (9/65). Para substâncias que não requerem classificação de irritação ocular o método apresenta acurácia de 69% (135/196), tendo uma proporção de 69% (61/89) de falsos-positivos e 0% (0/107) de falsos-negativos.

Uma das limitações deste método é que a reversibilidade do dano causado a córnea não pode ser avaliada, pois não são considerados injúrias a conjuntiva e a íris, bem como a toxicidade sistêmica associada a exposição ocular.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial de irritação/corrosão ocular do item de teste “*DEGESAN*” por meio do ensaio de BCOP, de acordo com o protocolo descrito na OECD TG437.

3. DEFINIÇÕES E SIGLAS

BPL	Boas Práticas de Laboratório
IR	Item de referência
ST	Sistema Teste
GQ	Garantia Qualidade
DE	Diretor Estudo
PE	Plano Estudo
IT	Instalação Teste
GIT	Gerente da Instalação Teste
GHS	<i>Globally Harmonized System for classification and labelling of chemicals / Sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos</i>
UN	<i>United Nations / Nações unidas</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
BCOP	<i>Bovine Corneal Opacity and Permeability</i>
OD	<i>Optical Density</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IVIS	Índice de irritação <i>in vitro</i> “ <i>In Vitro Irritancy Score</i> ”
IDT	Item de teste

4. DATAS

Início do Estudo		
18/06/2020		
FASE ANALÍTICA		
Ensaio	Análise	Repetições
14/07/2020	14/07/2020	0 vezes
Fase Crítica – Inspeção por processo		
10/06/2020		
23/01/2020		
16/01/2020		
Relatório Final		
24/07/2020		

5. ITENS DO ENSAIO

5.1. Item de teste

Nome do item de teste:	DEGESAN
Código do item de teste:	084610-01
Código do Patrocinador:	Não declarado
Lote:	15501
Fabricação:	01/05/2020
Validade:	01/05/2022
Características Físicas:	Líquido incolor
Armazenamento:	Ambiente

5.2. Item de controle positivo

Nomenclatura comercial	Etanol Absoluto
Nomenclatura IUPAC	<i>Ethanol</i>
CAS	64-17-5
Fórmula Estrutural	C ₂ H ₆ O
Fornecedor:	Merck
Código do fornecedor:	1.00983.1000
Lote:	K49257583
Pureza:	≥ 99.9%
Características Físicas	Líquido incolor
Armazenamento:	Ambiente

5.3. Item de controle negativo

Nomenclatura comercial	Cloreto de sódio
Nomenclatura IUPAC	<i>Sodium chloride</i>
CAS	7647-14-5
Fórmula Estrutural	NaCl
Fornecedor:	Dinâmica
Código do fornecedor:	1528-1
Lote:	108524
Validade:	30/02/2024
Pureza:	99%
Características Físicas	Pó branco
Armazenamento:	Ambiente

5.4. Sistema Teste (ST)

Nomenclatura Oficial:	Córnea Bovina
Data do Recebimento:	14/07/2020
Origem:	<i>Bos taurus</i>
Fornecedor:	Frigorífico CowPig LTDA
Lote INVITROCELL:	20.B19.000

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Materiais, reagentes e equipamentos

Materiais	Reagentes
Pipeta pasteur	Solução de Penicilina/Estreptomicina
Bécker	Solução de L-glutamina
Seringas de 20mL	Soro fetal bovino
Tesouras e pinças	Fluoresceína sódica
Ponteiras de 1000 e 200µl	Meio Eagle's Minimal Essential Medium
<i>Holder</i> s	Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
Microtubo	Tampão PBS sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺
Placa de 96 poços	Etanol

Equipamentos	Tags	Data Calibração	Validade Calibração
Bomba a vácuo	I-EG-016	Não se aplica	Não se aplica
Banho termostatizado	I-EG-050	Não se aplica	Não se aplica
Termohigrômetro	I-EM-038	11/09/2019	11/09/2020
Conjunto de filtros	BCM-P-007, BCM-P-008; BCM-P-009	29/01/2019	29/01/2021
Balança Analítica	I-EM-031	15/05/2020	15/05/2021
Espectrofotômetro	I-EM-001	07/01/2020	07/01/2021
Opacitômetro	N-E-BCM-002	Não se aplica	Não se aplica
Micropipeta 1000µL	I-EM-007	13/03/2020	13/03/2021

6.2. Referência Guias Oficiais de Teste ou Outros Métodos Utilizados

- ✓ OECD (2020), Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- ✓ POP-0038: ENSAIO DE PERMEABILIDADE E OPACIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP)

6.3. Delineamento experimental do estudo

6.3.1. Preparo do Sistema Teste (ST)

Apenas animais considerados saudáveis provenientes de abatedouros de produção para consumo humano foram utilizados como fornecedores de córneas para o teste BCOP. Os olhos são recolhidos no abatedouro e transportados em recipientes contendo uma solução de HBSS enriquecida com antibióticos (penicilina e estreptomicina).

Na instalação de teste, os olhos são examinados macroscopicamente, a fim de detectar possíveis alterações morfológicas (opacidade, cortes, arranhões, buracos, etc.). Apenas córneas íntegras foram utilizados no teste.

As córneas são isoladas e colocadas em suportes corneanos (*holders*) especialmente projetados (Figura 1), os quais consistem em compartimentos anterior e posterior, que interagem com os lados epitelial e endotelial da córnea, respectivamente. Ambas as câmaras são preenchidas com EMEM isento de vermelho de fenol pré-aquecido (câmara posterior primeiro), assegurando que nenhuma bolha é formada e a opacidade basal das córneas foi verificada imediatamente antes de iniciar o teste, usando o opacitômetro. Somente córneas que apresentem valores inferiores a 7 unidades de opacidade serão incluídas no teste. Córneas com opacidade maior que 7 unidades de opacidade serão descartadas. O suporte *holder* foi incubado a 32°C ± 1°C (1º período de incubação) durante pelo menos uma hora para permitir que as córneas se equilibrem com o meio e para reestabelecer a atividade metabólica normal (a temperatura aproximada da superfície da córnea *in vivo* é de 32°C). A medida inicial de opacidade foi realizada (Mt_0).

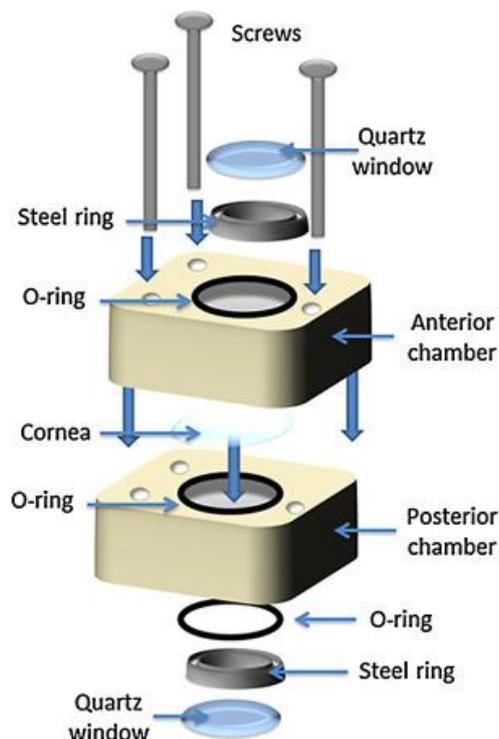


Figura 1. Câmara de teste utilizada no teste de Permeabilidade à Opacidade da Córnea Bovina (BCOP).

6.4. Procedimento de Tratamento

No final do primeiro período de incubação, o meio foi removido de ambos os compartimentos dos suportes, usando uma pipeta *pasteur* ligada a uma bomba de vácuo. O compartimento posterior foi então reabastecido com meio EMEM sem vermelho de fenol, enquanto o compartimento anterior foi preenchido com o composto de teste ou o seu veículo (controle negativo). Cada grupo de tratamento compreendia três córneas.

6.4.1. Preparo e aplicação do item de teste

O item de teste foi utilizado puro e foi aplicado diretamente sobre as córneas. Para tanto, 750 μ L do item de teste foram aplicados de modo a cobrir toda a superfície da córnea.

6.4.2. Preparo e aplicação do item de controle positivo

O item de controle positivo etanol foi aplicado puro. A quantidade de 750 μ L foi aplicado diretamente sobre as córneas.

6.4.3. Preparo e aplicação do item de controle negativo

Como item de controle negativo foi utilizada solução de NaCl a 0,9% (preparada em água de osmose reversa) e 750 μ L foram aplicados diretamente sobre as córneas.

6.4.4. Procedimentos do ensaio

O método utilizado no estudo foi a câmara fechada e os itens do estudo (item de teste, item de controle negativo e positivo) foram aplicadas de forma pura 750 µL no compartimento anterior.

As córneas foram incubadas na posição horizontal por 10 minutos a 32°C ± 1°C. As substâncias do estudo foram então removidas e as córneas foram lavadas pelo menos três vezes (até o meio estar límpido) com aproximadamente 4 ml de EMEM sem vermelho de fenol. O compartimento anterior foi reabastecido com meio EMEM sem vermelho de fenol. As córneas foram então novamente incubadas a 32°C ± 1°C (2º período de incubação), por 2 horas, antes que uma segunda medição de opacidade fosse feita.

Após o período de incubação, foi realizada uma segunda medida de opacidade (Mt₂). Os valores obtidos nesta segunda medida foram os utilizados para os cálculos, enquanto a primeira leitura foi considerada indicativa dos efeitos iniciais.

O opacitômetro determina a diferença na transmissão de luz entre uma córnea tratada e uma córnea de controle e exibe um valor numérico de opacidade (unidades arbitrárias). O aparelho foi previamente calibrado com 3 filtros calibradores (membrana opacas padronizadas de poliéster), e os valores obtidos com os itens de teste geralmente variaram entre 0 e 150.

A etapa de medição de permeabilidade do ensaio foi realizada imediatamente após a medição da opacidade. O meio EMEM foi novamente removido de ambas as câmaras de suportes e meio EMEM fresco sem que o vermelho de fenol fosse novamente cheio no compartimento posterior. 1 mL de solução de fluoresceína 4 mg/mL em tampão PBS para foi aplicado na câmara anterior (em contato com o epitélio da córnea). Os *holders* foram incubados novamente em posição horizontal por 90 min ± 5 min a 32°C ± 1°C. Após essa última de incubação, o meio de cultura da câmara posterior foi coletado e a densidade óptica (O.D.) determinada com um espectrofotômetro (490nm).

6.4.5. Cálculo do Índice de Irritação *in vitro* (IVIS)

A opacidade é determinada pela subtração da leitura de opacidade pós-tratamento (Mt₂) pela leitura de opacidade inicial (Mt₀) em opacitômetro OP-KIT. A permeabilidade da córnea é determinada por meio dos valores de absorbância de fluoresceína (OD₄₉₀) que permeou através das córneas.

A média dos valores de opacidade e de permeabilidade foram utilizados para calcular o índice de irritação *in vitro* (IVIS – “*In Vitro Irritancy Score*”), segundo a fórmula descrita abaixo:

$$IVIS = \text{média de opacidade} + (15 \times \text{média permeabilidade})$$

Tabela 1. Tabela de classificação da amostra segundo o índice de irritação ocular (IVIS) de acordo com OECD TG437 (2020)

Grau de Irritação (IVIS)	Classificação *UN GHS
≤ 3	Sem Categoria
> 3; ≤ 55	Nenhuma previsão independente pode ser feita**
> 55	Irritante Severo (Categoria 1)

*UN GHS: “*United Nations Globally Harmonized System*” - Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos.

**Nenhuma previsão pode ser feita a partir deste resultado isoladamente. O resultado do teste de BCOP será considerado no contexto de uma IATA para fins de classificação (OECD 2018, *Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris*).

NOTA: Para os itens de teste que apresentarem valor de IVIS > 3 e ≤ 55, não será possível realizar a previsão de classificação utilizando a metodologia de BCOP. Portanto, de acordo com o documento “*Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation*” (2019), testes adicionais como o guia OECD 491 (Test No. 491: *Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage*) deverá ser realizado para que seja feita a classificação de dano ocular, segundo o UN GHS.

6.4.6. Critério de aceitação do estudo

O teste é considerado aceitável se o item de controle positivo apresentar valor de IVIS entre os valores máximos e mínimos estabelecidos pela média histórica do laboratório atualizada (Tabela 2).

A resposta do item de controle negativo ou do item de veículo devem resultar em valores de opacidade e permeabilidade inferiores aos limites superiores estabelecidos para valores de opacidade e permeabilidade basal das córneas bovinas tratadas com o respectivo item de controle negativo ou solvente / veículo.

Um único teste composto por pelo menos três córneas deve ser suficiente para um item de teste quando a classificação resultante for inequívoca.

Tabela 2. Valores máximo e mínimos de IVIS histórico para o item de controle positivo (Etanol)

Referência	IVIS (limites mínimo e máximo)
ICCVAM, 2006	39,9 – 65,4
Instalação Teste INVITROCELL	34,7 – 65,6

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O item de controle negativo (NaCl 0,9%) não causou opacidade ou aumentou a permeabilidade da córnea e foi classificada como "Sem Categoria". O item de controle positivo etanol causou opacidade e aumentou a permeabilidade da córnea, e foi categorizado como "Nenhuma previsão independente pode ser feita" (valor IVIS de 54,57). O item de teste "DEGESAN" não causou opacidade ou aumento da permeabilidade da córnea e foi categorizada como "Sem Categoria" (IVIS - 0,02).

Os valores médios de opacidade e de permeabilidade dos itens de controle positivo e negativo bem como do item de teste "DEGESAN" estão descritos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Os dados brutos de opacidade e permeabilidade estão apresentados na Tabela 6 e 7 (Anexos). Na tabela 5 estão descritos os valores de IVIS e a classificação do potencial irritante das amostras segundo o guia OECD 437 (2020).

Tabela 3. Valores médios de opacidade

Itens do Ensaio	Média (Mopt)	DP	EPM
NaCl 0,9%	0,33	0,577	0,333
Etanol	32,67	7,211	4,163
DEGESAN	0,00	0,577	0,333

Legenda: Mopt = $(M_{t2}-M_{t0})_{substância} - (M_{t2}-M_{t0})_{NaCl}$; DP= desvio padrão; EPM = Erro padrão da média

Tabela 4. Valores médios de permeabilidade (OD₄₉₀)

Itens do Ensaio	Média (Mod)	DP	EPM
NaCl 0,9%	0,013	0,009	0,005
Etanol	1,46	0,029	0,017
DEGESAN	-0,001	0,006	0,003

Legenda: Mod = $(OD_{490} substância - OD_{490} NaCl)$; DP= desvio padrão; EPM = Erro padrão da média

Tabela 5. Classificação das amostras segundo o índice de irritação in vitro (IVIS)

Itens do Ensaio	IVIS	DP	EPM	Classificação
NaCl 0,9%	0,52	0,458	0,280	Sem Categoria
Etanol	54,57	6,810	3,932	Nenhuma previsão independente pode ser feita
DEGESAN	-0,02	0,496	0,286	Sem Categoria

Legenda: IVIS = índice de irritação in vitro; DP= desvio padrão; EPM = Erro padrão da média

O valor do IVIS obtido para o item de controle positivo etanol atende aos critérios de aceitação de acordo com a diretriz 437 da OCDE e os valores históricos da IT Invitrocell.

8. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodologia utilizadas no presente estudo, o item de teste “*DEGESAN*” do estudo S-0003-084610-01-B, encaminhada pela empresa **EXTRATO FLORA IND E COM DE CORRELATOS COSM. EPIS. E SANEAN. LTDA**, conclui-se que:

- I. *O item de teste “DEGESAN” não promoveu irritação ocular não sendo necessária a classificação/rotulagem para risco de irritação ocular (SEM CATEGORIA), segundo o preconizado na OECD 437 (2020).*

Este relatório destina-se exclusivamente ao uso interno da empresa **Extrato Flora Ind e Com de Correlatos Cosm. Epis. e Sanean. Ltda**, este documento não pode ser utilizado em quaisquer veículos de comunicação sem autorização por escrito do autor.

Os resultados e conclusões apresentados se aplicam somente ao item de teste recebido para análise não podendo ser estendidos por correlação ou similaridade. Quando necessário vincular o estudo realizado à fórmula do item de teste testado, esta estará anexa ao corpo deste documento.

9. ARMAZENAMENTO E RETENÇÃO DE REGISTROS E MATERIAIS

Todos os registros e itens de estudo relacionados ao código do estudo nº S-0003-084610-01-B serão arquivados na IT INVITROCELL, localizada na Av. Prof. Benedito Montenegro, 240, Betel, Paulínia/SP. Estes documentos são arquivados pelo arquivista.

9.1. Registros

Os registros mantidos incluem e não se limitam a: correspondências pertinentes aos estudos, desvios ou emendas no plano, caderno de laboratório, registros de cadeia de custódia, dados brutos e outros documentos relacionados à interpretação e avaliação dos resultados, bem como uma cópia do Relatório Final. Esses registros serão arquivados na IT Invitrocell por um período de 5 anos.

9.2. Desvio ou Emenda ao Plano de Estudo

Não houve desvios e/ou emenda ao Plano de Estudo.

9.3. Itens de Teste/Referência

Após a conclusão do estudo o item de teste do estudo será mantida no arquivo da IT INVITROCELL, localizada na Av. Prof. Benedito Montenegro, nº 240, Betel – Paulínia/SP, sob responsabilidade da Equipe Invitrocell durante o período de 1 mês.

Após o período de retenção, a IT procederá o descarte dos itens de teste de acordo com as orientações enviadas pelo patrocinador.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OECD (2020), Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

OECD (2020), Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

OECD (2017), Series on Testing & Assessment No. 263: Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, ENV/JM/MONO(2017)15.

11. ANEXOS
Tabela 6. Valores brutos de opacidade.

MÉDIA AJUSTADA DE OPACIDADE				
TRATAMENTO	RÉPLICA	Mt ₀	Mt ₂	Mopt (Mt ₂ -Mt ₀)
NaCl 0.9%	1	1	1	0
	2	1	2	1
	3	2	2	0
Etanol 99,5%	1	2	33	31
	2	3	44	41
	3	3	30	27
DEGESAN	1	3	3	0
	2	3	4	1
	3	3	3	0

Arquivo salvo em: \\Arara\Invitrocell\04_Clientes\EXTRATO FLORA\2020\084610\Resultado

Tabela 7. Valores brutos de permeabilidade (absorbância da fluoresceína - OD 490nm).

LayOut da Placa												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ICN 1	ICN 1	ICN 2	ICN 2	ICN 3	ICN 3						
B	ICP 1	ICP 1	ICP 2	ICP 2	ICP 3	ICP 3	ICP _{D1}	ICP _{D1}	ICP _{D2}	ICP _{D2}	ICP _{D3}	ICP _{D3}
C												
D	IDT 1	IDT 1	IDT 2	IDT 2	IDT 3	IDT 3						
E												
F												
G												
H	EMEM	EMEM	EMEM									

Legenda: ICN = Item de controle negativo (NaCl 0,9%); ICP = Item de controle positivo; ICP_D = Item de controle positivo diluído 1:5; IDT = Item de teste; IDT_D = Item de teste diluído 1:5; EMEM = Meio Eagle's Minimum Essential Medium;

DADOS BRUTOS DE ABSORBÂNCIA (490nm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0536	0,0525	0,0473	0,0469	0,0641	0,0644						
B	1,5089	1,5614	1,4745	1,4891	1,5241	1,5332	0,4573	0,4628	0,3909	0,4042	0,4131	0,4312
C												
D	0,0586	0,0576	0,0468	0,0473	0,0544	0,0554						
E												
F												
G												
H	0,0422	0,0422	0,0421									

Arquivo salvo em: \\Arara\Invitrocell\04_Clientes\EXTRATO FLORA\2020\084610\Resultado

*Assinado na última página se impresso.