



Avaliação do potencial de irritação ocular – Realizado pela Invitrocell

Este teste visa avaliar o potencial de irritação ocular de uma determinada substância ou produto. Trata-se de um teste “in vitro”, ou seja, não é realizado na população ao qual se destina seu uso (cães e gatos).

Este teste foi realizado na Invitrocell, a empresa, realiza testes *in vitro* de segurança e eficácia através de estudos celulares e moleculares, dando suporte às atividades de desenvolvimento de matérias-primas e produtos. Habilitada na ANVISA, seus estudos são aceitos por órgãos regulatórios em todo o mundo, para registro de produtos.

As formulações são aplicadas na córnea bovina adquirida em matadouros credenciados. Estas ficam em contato com a córnea por 1 hora. Após sucessivas lavagens, a córnea é avaliada em um aparelho chamado opacitômetro.

O opacitômetro mede o quanto aquela córnea que era transparente se tornou opaca após contato com a formulação. Quanto mais irritante maior a opacidade da córnea.

Nesse teste denominado BCOP também é avaliado se há um aumento da permeação de um corante. Quando em contato com as proteínas presentes na córnea, a formulação cosmética pode promover uma degradação destas fazendo com que a córnea, que é uma espécie de membrana, fique menos espessa. Desse modo, o corante utilizado para medir a permeação passa com mais facilidade pela córnea. Quanto mais permeável, maior foi o dano causado pelo produto aplicado e, conseqüentemente, maior o potencial de irritação deste produto.

O teste de BCOP atribui notas tanto para a permeação quanto para a opacificação da córnea e, por cálculos complexos é possível determinar se a formulação/produto aplicado é um irritante severo ou não. O resultado mais importante deste teste é determinar se o produto possui ou não irritação severa. O IVIS (escore de irritação “in vitro”) maior do que 55 determina irritação severa.

O teste de BCOP é um teste “in vitro” que possui uma acurácia de 79%, sendo portanto bastante confiável.

CONCLUSÃO: Tanto o SHAMPOO SENSY & TRAT – CRS ALÍVIO DÉRMICO quanto SHAMPOO SENSY & TRAT – MNT EQUILÍBRIO DÉRMICO obtiveram um grau de irritação ocular muito baixo e não classificado como irritante severo. O AQUA SERUM SENSY & TRAT foi classificado como não irritante. Todos tiveram o IVIS inferior a 5, índice muito baixo, podendo definir que todos os produtos são não irritantes.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DO PRODUTO
SHAMPOO 02
PELO MÉTODO DE BCOP
(BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY TEST)**

Relatório Final nº 030.T1-029-062038-03-N

INSTALAÇÃO DE TESTE: IT INVITROCELL – Invitrocell Avaliação Molecular e Celular Ltda.
Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240 - Betel, Paulínia / SP, Brasil
Telefone: +55 19 3749 8300
E-mail: invitrocell@invitrocell.com.br
Home Page: www.invitrocell.com.br

PATROCINADOR: G&Gcosmetica Ltda - ME
Av Doutora Nadir Aguiar
Incubadora Supera Modulo 6S, Jardim Doutor Paulo Gomes Rome
Ribeirão Preto - SP - 14056680 - Brasil
Telefone: (16) 997462010

Versão 01

07 de junho de 2017

PESSOAL RESPONSÁVEL**PATROCINADOR**

Nome: G&G Cosmetica Ltda - ME
Endereço: Av Doutora Nadir Aguiar
Incubadora Supera Modulo 6S, Jardim Doutor Paulo Gomes Rome
Ribeirão Preto - SP - 14056680 - Brasil
Telefone: (16) 997462010
E-mail de contato: comercial@zutticosmeticos.com (Murilo Dotti Garcia)

GERENTE DA INSTALAÇÃO DE TESTE (GIT) – IT INVITROCELL

Nome: Rodrigo Vieira Rodrigues
Endereço: Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240, Betel, Paulínia / SP, Brasil
Telefone: +55 (19) 3749-8309
E-mail de contato: rodrigo.vieira@grupoinvestiga.com

DIRETOR DE ESTUDO (DE)

Nome: Andréa Costa Fruet
Endereço: Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240, Betel, Paulínia / SP, Brasil
Telefone: +55 (19) 3749-8309
E-mail de contato: andrea.fruet@grupoinvestiga.com

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 substância 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: Andréa Costa Fruet

Endereço: Av. Benedito Montenegro,240, Paulínia-SP

Telefone: (19) 3749-8309

End. Eletrônico: andrea.fruet@grupoinvestiga.com



07/06/2017

EQUIPE IT INVITROCELL	
Nome	Responsabilidade
Rodrigo Vieira Rodrigues	Gerente da Instalação Teste
Heliara Lopes do Nascimento	Garantia da Qualidade
Andrea Costa Fruet	Diretor(a) de Estudo
Andrea Costa Fruet	Recebimento de Amostras
Andrea Costa Fruet	Arquivista

RESUMO

O ensaio de BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*) é um método alternativo ao uso de animais desenvolvido em substituição ao teste de Draize (1944), e avalia o potencial de irritação ocular tópica de substâncias químicas. Neste método, como sistema teste, é utilizado a córnea bovina, pois preserva a curto prazo as funções fisiológicas e bioquímicas normal do tecido vivo. No presente estudo, a substância teste *Shampoo 02* foi avaliada quanto aos danos físicos causados à córnea como opacidade e aumento da permeabilidade através da membrana. A substância teste foi aplicada diluída a 10% (p/v) em NaCl 0.9% sobre a córnea e foi realizada incubação por 10 minutos seguido de 2 horas. Como controle negativo e positivo do ensaio foram utilizados a solução salina NaCl 0.9% e o Etanol 99,5%, respectivamente. Para o controle negativo NaCl não foi observado opacidade ou aumento da permeabilidade da córnea, sendo classificado como “Sem Categoria”. O controle positivo Etanol 99,5% ocasionou opacidade e aumento da permeabilidade da córnea, sendo categorizado como “Nenhuma previsão pode ser feita”. A substância teste *Shampoo 02* induziu um leve aumento da opacidade e da permeabilidade da córnea, não sendo possível categorizá-la como “Não irritante” ou “Irritante severo”, segundo o método de BCOP de acordo com o guia OECD 437 (2013).

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) do sistema de harmonização global para classificação e rotulagem de substâncias químicas (*Globally Harmonized System for classifications and labelling of chemicals* – GHS). Portanto, o método apenas permite classificar substâncias como “corrosivos oculares e irritantes severos” (Categoria 1) ou como não irritantes oculares, 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/corrosividade ocular da substância teste *Shampoo 02* por meio do ensaio de BCOP, de acordo com o protocolo descrito na OECD TG437.

3. DEFINIÇÕES E SIGLAS

BPL	Boas Práticas de Laboratório
SBT	Substância Teste
ST	Sistema Teste

4. DATAS

Início do Estudo	
11/04/2017	
FASE ANALÍTICA	
Início	Término
22/05/2017	07/06/2017
Término do Relatório Final	
07/06/2017	

6.3.4. Preparo e aplicação substância do controle negativo

Solução salina de cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) foi utilizada como controle negativo. Para tanto, foram aplicados 0,75 mL sobre as córneas.

6.3.5. Método de incubação

O método utilizado foi o de câmara fechada e as córneas ficaram expostas à substância teste por um período de 10 minutos seguido de 2 horas de incubação em meio de cultura.

6.3.6. Procedimentos

O ensaio de irritação ocular em córnea bovina (“*Bovine Corneal Opacity and Permeability*” - BCOP) foi realizado de acordo com os procedimentos descritos no *POP-0038: ENSAIO DE PERMEABILIDADE E OPACIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP)* e na *NORMA-0007: OECD 437 - ENSAIO DE PERMEABILIDADE E OPACIDADE EM CÓRNEA BOVINA*.

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

A opacidade é determinada pela subtração da leitura de opacidade pós-tratamento (Mt_2) pela leitura de opacidade inicial (Mt_0). A permeabilidade da córnea é determinada por meio dos valores de absorbância de fluoresceína (OD_{490}) que permeou através das córneas.

A média dos valores de opacidade e de permeabilidade foram utilizados para calcular o grau 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 grau de irritação ocular (IVIS) de acordo com OECD TG437 (2013)

Grau de Irritação (IVIS)	Classificação *UN GHS
≤ 3	Sem Categoria
$> 3; \leq 55$	Nenhuma previsão 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.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de opacidade e de permeabilidade dos controles positivo e negativo bem como da substância teste *Shampoo 02* estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os dados brutos de opacidade e permeabilidade estão apresentados na Tabela 5 e 6 (Anexos). Na tabela 4 estão descritos os valores de IVIS e a classificação do potencial irritante das amostras segundo o guia OECD 437 (2013).

Tabela 2. Valores médios de opacidade

Substâncias Teste	Média (Mopt)	Desvio Padrão	Erro padrão da média
NaCl 0,9%	0,25	0,500	0,224
Etanol 99,5%	33,25	11,619	5,809
Shampoo 02	1,75	0,816	0,408

$$Mopt = (Mt_2 - Mt_0)_{Amostra} - (Mt_2 - Mt_0)_{NaCl}$$

Tabela 3. Valores médios de permeabilidade (OD₄₉₀)

Substâncias Teste	Média (Mod)	Desvio Padrão	Erro padrão da média
NaCl 0,9%	0,01	0,009	0,004
Etanol 99,5%	1,18	0,163	0,082
Shampoo 02	0,20	0,117	0,059

$$Mod = (OD_{490} amostra - OD_{490} NaCl)$$

Tabela 4. Classificação das amostras segundo o potencial de irritação in vitro (IVIS)

Substâncias Teste	IVIS	Desvio Padrão	E.P.M.	Classificação
Etanol 99,5%	50,90	12,547	6,273	Nenhuma previsão pode ser feita
Shampoo 02	4,81	2,415	1,207	Nenhuma previsão pode ser feita

IVIS = Escore de Irritação *in vitro*

E.P.M.= Erro padrão da média

8. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodologia utilizadas no presente estudo, a substância teste **Shampoo 02**, encaminhada pela empresa **G&G Cosmética Ltda - ME**, conclui-se que:

- I. *A substância teste Shampoo 02* não se enquadra nas categoria “*Não irritante*” (Categoria 0) ou “*Irritante Severo*” (Categoria 1, UN GHS).

Este relatório destina-se exclusivamente ao uso interno da **G&G Cosmética Ltda - ME**, não podendo ser utilizado em quaisquer veículos de comunicação sem autorização por escrito do autor.

Os resultados e conclusões apresentados se aplicam somente à substância recebida para análise não podendo ser estendidos por correlação ou similaridade. Quando necessário vincular o estudo realizado à fórmula da substância testada, esta estará anexa ao corpo deste documento