



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.

**ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR
DA SUBSTÂNCIA TESTE
SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRATCONTROLE DA OLEOSIDADE
EM CÓRNEA BOVINA IN VITRO**

Relatório Final nº 030.T1-029-066485-01-N

INSTALAÇÃO DE TESTE 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: *CENTAGRO– CENTRO TECNOLÓGICO AGROPECUÁRIO LTDA*
Rua Prudente de Moraes, 157, Centro, 14300-000, Batatais-SP
Telefone: (16) 3660-3300

24 de novembro de 2017

PESSOAL RESPONSÁVEL**PATROCINADOR**

Nome: CENTAGRO – CENTRO TECNOLÓGICO AGROPECUÁRIO LTDA
Endereço: Rua Prudente de Moraes, 157, Centro, 14300-000, Batatais-SP
Telefone: (16) 3660-3300.
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 CEP: 13148-189*
Telefone: *(19) 3749-8309*
E-mail de contato: *rodrigo.vieira@invitrocell.com.br*

DIRETOR DE ESTUDO (DE)

Nome: *Andrea Costa Fruet*
Endereço: *Av. Prof. Benedicto Montenegro, 240, Betel, Paulínia/SP, Brasil CEP: 13148-189*
Telefone: *(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: Andrea Costa Fruet

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

Telefone: (19) 3749-8309

E-mail: andrea.fruet@grupoinvestiga.com



24/11/2017

EQUIPE ITINVITROCELL	
Nome	Responsabilidade
Rodrigo Vieira Rodrigues	Gerente da Instalação Teste
Andrea Costa Fruet	Diretor (a) de Estudo
Jéssica Natália de Azevedo	Analista
Camila Gallo e Jéssica Natália de Azevedo	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 OIL CONTROL SENSY & TRAT-CONTROLE DA OLEOSIDADE* 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% 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% apresentou IVIS de 38,82, sendo categorizado como “Nenhuma previsão pode ser feita”, em acordo com o preconizado no guia OECD 437. A substância teste *SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT-CONTROLE DA OLEOSIDADE* apresentou IVIS 3,25 e foi categorizada como “Nenhuma previsão pode ser feita”.

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 OIL CONTROL SENSY & TRAT- CONTROLE DA OLEOSIDADE 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	
23/11/2017	
FASE ANALÍTICA	
Início Ensaio	Término Ensaio
24/11/2017	24/11/2017
Relatório Final	
24/11/2017	

6.3.3. Preparo e aplicação substância do controle positivo

O controle positivo (Etanol 99,5%) foi aplicado puro, sem diluições, diretamente sobre as córneas. Para tanto, 0,75 mL foram aplicados diretamente sobre as córneas.

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 diretamente sobre as córneas.

6.3.5. Método de incubação

O método de incubação 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.

6.3.6. Procedimentos

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

$$IVIS = \frac{M_{t_2} - M_{t_0}}{M_{t_0}} \times \frac{OD_{490}}{OD_{490} \text{ controle}} \times 100$$

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 OIL CONTROL SENSY & TRAT- CONTROLE DA OLEOSIDADE 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)	DP	EPM
NaCl 0,9%	0,00	0,000	0,000
Etanol 99,5%	20,75	0,957	0,479
SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT CONTROLE DA OLEOSIDADE	0,75	0,957	0,479

Legenda: **Mopt** = $(M_{t2}-M_{t0})_{Amostra} - (M_{t2}-M_{t0})_{NaCl}$; DP=Desvio Padrão; EPM = Erro padrão da Média

Tabela 3. Valores médios de permeabilidade (OD₄₉₀)

Substâncias Teste	Média (Mod)	DP	EPM
NaCl 0,9%	0,01	0,002	0,001
Etanol 99,5%	1,20	0,080	0,040
SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT CONTROLE DA OLEOSIDADE	0,17	0,059	0,029

Legenda: **Mod** = $(OD_{490} amostra - OD_{490 NaCl})$; DP=Desvio Padrão; EPM = Erro padrão da Média

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

Substâncias Teste	IVIS	DP	EPM	Classificação
NaCl 0,9%	0,13	0,027	0,014	Não irritante
Etanol 99,5%	38,82	1,846	0,923	Nenhuma previsão pode ser feita
SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT - CONTROLE DA OLEOSIDADE	3,25	1,750	0,880	Nenhuma previsão pode ser feita

Legenda: IVIS = Índice de irritação *in vitro*; DP=Desvio Padrão; EPM = Erro padrão da Média

8. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodologia utilizadas no presente estudo, a substância teste **SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT CONTROLE DA OLEOSIDADE** encaminhada pela empresa **CENTAGRO – CENTRO TECNOLÓGICO AGROPECUÁRIO LTDA** conclui-se que:

- I. *A substância teste SHAMPOO OIL CONTROL SENSY & TRAT- CONTROLE DA OLEOSIDADE foi categorizada como “Nenhuma previsão pode ser feita”, em acordo com o preconizado no guia OECD 437.*

Este relatório destina-se exclusivamente ao uso interno da **CENTAGRO – CENTRO TECNOLÓGICO AGROPECUÁRIO LTDA** 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