



Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA
Veja o escopo no site da ANVISA
www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_008.htm

Relatório do estudo: RE.421.0717.09

Título do estudo: Avaliação da Irritação Ocular da Substância teste VANTOCIL DC em Coelhos

Metodologia: INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da Qualidade: Ensaio de Irritação Ocular**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz, nº 65.3330.004, revisão N°06, 09 de Julho de 2007. 14p.

Diretora de estudo: Kátia Fernanda Claudino

Laboratório Executor: **BIOAGRI Laboratórios Ltda.**
Rod. SP 127, Km 24, Fone: (19) 3429-7700 – Fax: (19) 3429-7723
Cx. Postal: 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba – S.P. – Brasil
www.bioagri.com.br; bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador: **ARCH QUÍMICA BRASIL LTDA**
Avenida Brasília, 1500 bairro: Buru CEP: 13327-901
Fone: (11) 4028-8027 Fax: (11) 4028-8109
Salto-SP-Brasil

Conclusão do Relatório: 30/Out/2009





ANALI 008

Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA
Veja o escopo no site da ANVISA
www.anvisa.gov.br/reblas/bio/analitico/analitico_008.htm

Declaração de acompanhamento do estudo

O estudo descrito neste Relatório Final foi executado sob nossa supervisão, de acordo com o Plano de Estudo e procedimentos descritos no método INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) nº 65.3330.004 (2007) e em conformidade com os critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das Boas Práticas de Laboratórios (BPL) GGLAS 02/BPL (2001).

Este relatório representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Plano de estudo, cópia do relatório final e todos os dados e observações referentes a este estudo, são arquivados na BIOAGRI Laboratórios Ltda.

Kátia F. Claudino
Kátia Fernanda Claudino
Diretora de Estudo
Fone: (19) 3429-7760

05 / Nov / 2009
dd mmm aaaa

Márcio Adriani Gava
Márcio Adriani Gava
Diretor Técnico
Fone: (19) 3429-7727

11 NOV 2009
dd mmm aaaa



Declaração da Garantia da Qualidade

Este estudo foi conduzido segundo os princípios das Boas Práticas de Laboratórios (BPL) e em conformidade com os critérios para a habilitação de laboratórios GGLAS 02/BPL (2001).

Este relatório foi revisado pela Garantia da Qualidade – BIOAGRI. As datas e fases de auditoria no estudo estão relacionadas na tabela abaixo:

Auditoria		Data das informações relatadas	
Data	Fase	Diretor de estudo	Diretor Técnico
09/Out/2009	Plano de estudo	09/Out/2009	09/Out/2009
28/Out/2009	Relatório do estudo	29/Out/2009	30/Out/2009

A auditoria de processo mais recente da fase laboratorial desta classe de estudo foi realizada em 21/Jul/2009. Esta auditoria está registrada no documento interno RAS 087/09

Os resultados e observações apresentados neste relatório final são descrições precisas dos dados brutos gerados durante a condução do estudo.


Andreza Pampolini de Souza
Garantia da Qualidade
Fone: (19) 3429-7733

04 / Nov / 2009
dd mmm aaaa



1. Informações

1.1. Do estudo

Início do estudo:	08/10/2009
Início da fase experimental:	12/10/2009
Final da fase experimental:	16/10/2009
Conclusão do relatório:	29/10/2009
Número da proposta:	50905
Corpo técnico:	Diretora de Estudo: Kátia Fernanda Claudino Pesquisadora: Roseane P. B. Bernardini Técnica de laboratório: Daniela Ferraz Menezes Ajudante de laboratório: Pedro Goiaro



1.2. Da substância teste

Substância teste:	VANTOCIL DC
Recebida em:	16/09/2009
Lote:	8BR340DESC
Data de fabricação:	05/12/2008
Data de validade:	05/12/2010
Código da Bioagri:	DOM-01770/09
Composição declarada (%) (patrocinador):	CONFIDENCIAL
Concentração declarada do ativo (%) (patrocinador):	
Concentração analisada do ativo (%) (Bioagri):	
Certificado de Análise:	BA 0193/09 e BA 0114.0194/09
Substância teste enviada por:	ARCH QUÍMICA BRASIL LTDA

2. Objetivo

O objetivo é avaliar o potencial de irritação e/ou corrosão da substância teste VANTOCIL DC quando administrada pela via ocular em coelhos.

3. Definições

Irritação ocular: é a produção de lesões reversíveis no tecido ocular do animal após a aplicação da substância teste na superfície anterior do olho.

Corrosão ocular: é a produção de lesões irreversíveis no tecido ocular do animal após a aplicação da substância teste na superfície anterior do olho.

Substância teste: é qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

4. Material e métodos

Este estudo foi conduzido pelo método INCQS N° 65.3330.004 (2007) (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), em conformidade com os critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório (BPL), GGLAS 02/BPL, habilitação de laboratório junto à REBLAS, segundo



Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA

Veja o escopo no site da ANVISA

www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anal/analitico_008.htm

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001) e Procedimento Operacional Padrão da Bioagri Laboratórios Ltda., POP-M 1000 (Teste de Irritação Ocular (INCQS), Rev. 11).

4.1. Seleção do sistema-teste

Este estudo foi conduzido com cinco coelhos brancos, Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), 05 fêmeas, nulíparas e não prenhas, adultos jovens, saudáveis com idade de 13 semanas, pesando entre 2,0 e 3,0 kg, fornecidos por Cláudio Rúbia Lopes – Piracicaba/ SP – Brasil.

4.1.1. Justificativa da seleção do sistema-teste

O coelho é a espécie mais usada para testar irritação/corrosão ocular e é a espécie recomendada por várias agências regulatórias. O coelho é o modelo universal para avaliar toxicidade de várias classes de agentes químicos e para qual existe uma base de dados históricos (Gad & Chengelis, 1998).

4.1.2. Declaração de acompanhamento de bem-estar animal

Este estudo foi realizado em conformidade com todas as leis aplicáveis ao bem estar de uso e cuidado humanitário de animais de laboratório. Sempre que possível, os procedimentos são delineados visando evitar ou minimizar desconforto, angústia ou dor aos animais.

4.2. Preparo do sistema-teste

Os animais empregados neste estudo foram selecionados de uma população estoque saudável. Todos os coelhos foram examinados antes da aclimação. Os coelhos foram aclimatados nas condições do laboratório por um período de no mínimo 5 dias, antes da aplicação da substância teste.

Os animais previamente selecionados para o teste passaram por exames de ambos os olhos 24 horas antes do início do teste. A superfície da córnea de ambos os olhos foi examinada empregando-se fluoresceína sódica a 1% e luz ultravioleta. Animais que apresentaram irritação, defeitos oculares e injúrias nas córneas não foram utilizados. O procedimento foi registrado nos dados brutos.

4.3. Condições de alojamento e alimentação dos animais

Os animais foram individualmente alojados em gaiolas (40x40x40 cm) devidamente identificadas com placas metálicas onde constou o código da amostra, código do estudo, data de início e data de término do ensaio, sexo e espécie. A temperatura da sala dos animais foi mantida em 20°C (\pm 3°C), bem como a umidade relativa do ar entre 30 e 70%. Luz artificial foi proporcionada aos animais, em ciclos sequenciais de 12 horas de luz e 12 horas sem luz e as trocas de ar programadas para 10 a 15/hora.

Ração comercial peletizada para coelhos (Nome Comercial: Purina Nutricóelhos; Marca: Agribands Purina do Brasil Ltda) foi oferecida *ad libitum*, supridas em cochos metálicos. Amostras de lotes de ração e de água são regularmente avaliadas pela BIOAGRI Laboratórios Ltda./SP quanto à qualidade microbiológica e micotoxinas que devem estar dentro do padrão de qualidade esperado para ração. Água filtrada foi suprida, *ad libitum*, por um sistema contínuo de distribuição nas gaiolas e é avaliada quanto à qualidade microbiológica; a mesma atende aos padrões de potabilidade.

4.4. Preparo da substância teste

A substância teste foi aplicada pura.

4.5. Dose e aplicação da substância teste

A pálpebra inferior do olho direito do animal foi puxada cuidadosamente e com o auxílio de uma seringa estéril foi aplicado 0,1 mL da substância teste pura no saco conjuntival inferior. As pálpebras do animal foram fechadas e mantidas juntas por aproximadamente trinta segundos, para prevenir perdas do produto. O olho esquerdo do animal, que não recebeu o tratamento foi utilizado como controle. Os olhos dos animais foram lavados somente 24 horas após a aplicação da substância teste.





Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA
Veja o escopo no site da ANVISA
www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_008.htm



4.6. Pesagem

O peso de cada animal foi verificado antes da aplicação da substância teste e após o registro da última avaliação.

4.7. Período de observação

As reações oculares de opacidade e área de comprometimento da córnea, hiperemia dos vasos da íris e hiperemia conjuntival, quemose e secreção nas conjuntivas, foram avaliadas 24, 48, 72 horas e 7 dias após a aplicação da substância teste.

O grau de reações oculares (córnea, íris e conjuntiva) foi registrado em cada período de avaliação seguindo o Sistema de Graduação de Lesões Oculares, conforme o Quadro 1 (INCQS, 2007).

Quadro 1. Graduação das reações oculares.

CÓRNEA*	
A – Opacidade (grau de densidade)	Graduação
Sem opacidade	0
Área difusa ou disseminada, detalhes da íris claramente visíveis (perda de brilho)	1
Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	2
Área opalescente, nenhum detalhe da íris visível, tamanho da pupila pouco discernível	3
Opaca, íris invisível	4
B – Área da córnea envolvida	Graduação
Córnea normal	0
Um quarto (ou menos), mas não zero	1
Maior do que um quarto e menor do que a metade	2
Maior do que a metade e menor do que três quartos	3
Maior do que três quartos até a área total	4
ÍRIS	
C – Íris	Graduação
Normal	0
Raias com congestão, edema, injeção circuncorneal (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas), íris ainda reage à luz (reação lenta é positiva)	1
Nenhuma reação à luz, hemorragia, destruição (qualquer uma ou todas essas)	2
CONJUNTIVAS	
D – Hiperemia (refere-se às conjuntivas palpebrais e bulbares, excluindo-se córnea e íris)	Graduação
Vasos normais	0
Vasos definitivamente injetados acima do normal	1
Vermelho intenso mais difuso e vasos individuais não facilmente discerníveis	2
Vermelho escuro difuso	3
E – Quemose	Graduação
Ausência de edema	0
Alguns edema acima do normal (incluindo a membrana nictante)	1
Edema óbvio com eversão parcial das pálpebras	2
Edema com as pálpebras cobrindo metade do olho	3
Edema com pálpebras cobrindo de metade ao fechamento total do olho	4
F – Secreção	Graduação
Ausência de secreção	0
Qualquer quantidade diferente do normal	1
Secreção com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes a estas	2
Secreção com umedecimento das pálpebras, pêlos e área considerável ao redor do olho	3

Fonte: INCQS (2007).

4.8. Classificação da substância teste

Para cada animal foi obtida uma leitura considerando-se as reações oculares avaliadas e calculou-se a média de leitura para cada intervalo de tempo. O maior valor obtido entre estas médias (excetuando a média do 7º dia) foi denominado de média máxima ($ME_{máx}$). Obteve-se, então, a faixa de confiança (Fc): $Fc = ME_{máx} \pm 5$. A definição da classe da substância teste foi realizada de acordo com o Quadro 2, sendo que:



Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA

Veja o escopo no site da ANVISA
www.anvisa.gov.br/reblas/bioanalitico_008.htm

- se foram encontrados dois valores de leitura na faixa de confiança, considerou-se o ME_{\max} para quantificação das lesões;
- se não foram encontrados dois valores, considerou-se o segundo maior valor de média da leitura como ME_{\max} para quantificação das lesões.

Quadro 2. Avaliação da classe da substância teste.

Classe	Faixa (Quantificação das Lesões)	Classificação
I	0 – 14,9	Produto não irritante
II	15 – 24,9	Produto irritante leve
III	25 – 49,9	Produto irritante moderado
IV	50 – 79,9	Produto irritante severo
V	80 – 110,0	Produto irritante máximo

Fonte: INCQS (2007).

A classificação final da substância teste foi feita através da avaliação da média máxima, conforme Quadro 2. Posteriormente, foi realizada a confirmação ou alteração da classificação de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3. Classificação final da substância teste.

Classificação	Confirmação da classificação final
CLASSE I Não irritante	Se $M_{24h} \leq 2,4 \Rightarrow$ classe I; se $M_{24h} > 2,4 \Rightarrow$ ir para classe II
CLASSE II Irritante Leve	(1) $M_{48h} \leq 2,4 \Rightarrow$ classe II; se $M_{48h} > 2,4 \Rightarrow$ ir para item 2 (2) $M_{72h} \leq 2,4 \Rightarrow$ classe II; se $M_{72h} > 2,4 \Rightarrow$ ir para classe III
CLASSE III Irritante Moderado	(1) $M_{7d} \leq 20 \Rightarrow$ ir para o item 2; se $M_{7d} > 20 \Rightarrow$ ir para a classe IV (2) $L_{7d} \leq 10$ em pelo menos três animais – classe final III; se $L_{7d} > 30$ em pelo menos um animal – classe IV
CLASSE IV Irritante Severo	(1) $M_{7d} \leq 40 \Rightarrow$ ir para o item 2; se $M_{7d} > 40 \Rightarrow$ ir para a classe V (2) $L_{7d} \leq 30$ em pelo menos três animais – classe IV; se $L_{7d} > 60$ em pelo menos um animal – classe V
CLASSE V Irritante Máximo	(1) $M_{7d} > 40 \Rightarrow$ ir para o item 2 (2) Se $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal – classe V

Fonte: INCQS (2007).

5. Resultados

A Tabela 1 relaciona os pesos dos animais e as reações oculares individuais, respectivamente, nos períodos avaliados. O peso dos animais foi avaliado no início e final do teste.

Tabela 1. Peso inicial e final dos animais e reações oculares observadas nos períodos avaliados.

Animal nº		01			02			03			04			05		
Peso (g)	Inicial	2219,3			2328,7			2515,3			2618,3			2719,3		
	Final	2462,7			2539,3			2718,6			2719,7			2910,3		
Sexo		♀			♀			♀			♀			♀		
Tempo de Observação		Horas			Horas			Horas			Horas			Horas		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Córnea	densidade (a)	2	3	3	2	3	3	2	2	2	2	2	3	2	3	3
	área (b)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sub-total (axb)x5	40	60	60	40	60	60	40	40	40	40	40	60	40	60	60
Íris	irite (c)	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
	sub-total cx5	5	10	10	5	10	10	5	10	10	5	10	10	5	10	10
	hiperemia (d)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Conjuntiva	quemose (e)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	secreção (f)	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2	3	2	2	3
	sub-total (d+e+f)x2	16	16	16	16	16	16	14	14	16	14	14	16	14	14	16
Total		61	86	86	61	86	86	59	64	66	59	64	86	59	84	86





Laboratório Analítico Habilitado pela ANVISA
Veja o escopo no site da ANVISA
www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_008.htm

Os animais apresentaram as seguintes alterações no tecido ocular: opacidade e área de opacidade, irite, hiperemia, quemose e secreção nos cinco animais nas avaliações de 24, 48 e 72 horas. Os cinco animais apresentaram necrose nas membranas conjuntivas nas avaliações de 1, 24, 48 e 72 horas.

Devido aos animais terem apresentado lesões irreversíveis, o mesmo foi humanamente eutanasiado e os valores da última leitura realizada foram repetidos nas leituras subseqüentes, em acordo com a metodologia e normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Bioagri Laboratórios.

Para cada animal obteve-se uma leitura por período avaliado, considerando-se as reações oculares avaliadas. Na Tabela 2 consta as leituras médias obtidas nos períodos avaliados.

Tabela 2. Leituras médias obtidas nos períodos avaliados.

Animal nº	Período de Leitura			
	24 h	48 h	72 h	7º dia
01	61	86	86	86
02	61	86	86	86
03	59	64	66	66
04	59	64	86	86
05	59	84	86	86
Média	59,80	76,80	82,00	82,00

A substância teste apresentou média máxima de 82,00, calculada conforme descrito no item 4.8.

6. Conclusão

Considerando os resultados obtidos e a metodologia adotada, a substância teste VANTOCIL DC apresentou Média Máxima de 82,00, sendo classificada como um produto irritante máximo.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios para habilitação de laboratórios segundo os princípios das Boas Práticas de Laboratórios (BPL); Procedimento GGLAS.02/BPL; Habilitação de laboratórios junto à REBLAS. Rev.00, 1ª Edição. Brasília: ANVISA, 2001. 35p.

GAD, S.C.; CHENGELIS, C.P. **Acute Toxicology Testing**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1998. Capítulo 11, p. 305-355: Considerations specific to animal test models.

Fim do relatório

