

BOLETIM DE ANÁLISE BA LEC- 00003/21

DADOS REFERENTES AO CLIENTE	
Patrocinador:	MEFA CONSULTORIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA.
Endereço:	Rua: Rua Juiz David Barrilli, 304
Contato:	Roberto Varella

DADOS REFERENTES À AMOSTRA	
Identificação do item de ensaio:	MEFA L
Código do item de ensaio (Bioagri):	SAN-0669-01/21
Lote da amostra:	--
Ingrediente ativo:	--
Nº da Proposta:	06190/20 Rev. 2
Data do recebimento do item de ensaio:	01/Jun/2021
Data de fabricação:	--
Data de validade:	--
Data de início do teste definitivo:	03/Set/2021
Data do fim do teste definitivo:	07/Set/2021

DADOS DE ANÁLISE	
Parâmetro analisado: Toxicidade Aguda para o peixe <i>Danio rerio</i> .	
Metodologia utilizada: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, nº 203 (OECD, 2019).	

Definições	
CL ₅₀ ; 96 horas: concentração da amostra que causa imobilidade a 50% dos organismos-teste, no período de 96 horas de exposição.	

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA	
Parâmetro	CL ₅₀ ; 96 horas (mg/L)
MEFA L	Superior a 100 mg/L

Obs: Os resultados das análises referem-se somente às itens de ensaio analisados.
Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Piracicaba, 09 de Setembro de 2021.


 Ayrton Santana da Silva
 Responsável Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE BA LEC- 00003/21

DADOS ADICIONAIS

Tabelas

Tabela 1 – Observação da Mortalidade – Teste Definitivo

Concentração nominal (mg/L)	Número de peixes mortos no período testado					
	3h	6h	24h	48h	72h	96h
Controle água	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0

Obs: Em cada concentração e tratamento controle foram expostos 7 peixes.

Obs 2: Uma vez que o produto foi recebido em sua forma concentrada (não considerada sua forma final) foi orientado pelo patrocinador o preparo preliminar de diluição de 1:30 (amostra/água) antes da condução do experimento. Sendo assim:

- 1) Foi pesado 0,1 grama da amostra
- 2) Diluída em 3 gramas de água
- 3) Solubilizado e então considerado como amostra inicial para o preparo das concentrações teste.

Substância de referência

A CL₅₀ 24 horas para a substância de referência dicromato de potássio foi 169,30 mg/L, com intervalo de confiança 95% de 141,39 a 202,73 mg/L. Esta resposta com dicromato de potássio confirma a sensibilidade dos organismos utilizados no presente bioensaio (OECD, 203).

Análise Estatística

Programa estatístico utilizado: Trimmed Spearman-Kärber.

BOLETIM DE ANÁLISE BA LEC-00004/21

DADOS REFERENTES AO CLIENTE	
Patrocinador:	MEFA CONSULTORIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA
Endereço:	Rua: Rua Juiz David Barrilli, 304, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS/SP.
Contato:	Roberto Varella

DADOS REFERENTES À AMOSTRA	
Identificação do item de ensaio:	MEFA L
Código do item de ensaio (Bioagri):	SAN-0669-01/21
Lote da amostra:	--
Nº da Proposta:	06190/20 - Rev. 2
Data do recebimento do item de ensaio:	01/Jun/2021
Quantidade recebida:	812g
Data de fabricação:	--
Data de validade:	--
Data de início do ensaio:	08/Set/2021
Data do fim do ensaio:	10/Set/2021

DADOS DE ANÁLISE	
Parâmetro analisado:	Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> .
Metodologia utilizada:	OECD (2004), Test No. 202: <i>Daphnia sp. Acute Immobilisation Test</i> , OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2004.

Definições	
CE ₅₀ ; 48 horas:	concentração da amostra que causa imobilidade a 50% dos organismos-teste, no período de 48 horas de exposição.
IC (Intervalo de Confiança):	é a incerteza de medição ao nível de 95% de confiança.

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA		
Parâmetro	CE ₅₀ ; 48 horas (mg/L)	IC (mg/L)
Toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	> 100	-

Obs: Os resultados das análises referem-se somente às itens de ensaio analisados.
Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Piracicaba, 16 de Setembro de 2021.

Francine I. Vacchi

Francine Inforçato Vacchi
Responsável Técnico
CRQ: 04271229

BOLETIM DE ANÁLISE BA LEC-00004/21

DADOS ADICIONAIS

Tabelas

Condições do Ensaio

Água de diluição e controle: meio M4
Temperatura (°C) durante a incubação - Máx: 19,8 Min: 19,2
Organismo-teste: <i>Daphnia magna</i> Idade: 6 a 24 horas
Número de organismos por concentração: 20 Número de réplicas por concentração: 4
Fotoperíodo: 16 horas luz e 8 horas escuro

Resultados

Concentração teste (mg/L)	Número de organismos imóveis - 48 horas					
	I	II	III	IV	Total	% de imobilidade
100	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0
Controle	0	0	0	0	0	0

Obs: Uma vez que o produto foi recebido em sua forma concentrada, foi orientado pelo patrocinador o preparo da diluição na proporção de 1:30 (amostra/água) antes da condução do experimento. Sendo assim:

- 1) Foi pesado 0,1 grama da amostra
- 2) Diluída em 3 gramas de água
- 3) Solubilizado e então considerado como amostra inicial para o preparo das concentrações teste.

Substância de referência

A CE50 24 horas para a substância de referência cloreto de potássio foi 776,79 mg/L, com intervalo de confiança 95% de 739,24 a 816,24 mg/L. Esta resposta confirma a sensibilidade adequada dos organismos utilizados nesta análise (OECD, 2004).

Análise Estatística

Programa estatístico utilizado: Trimmed Spearman-Kärber.

BOLETIM DE ANÁLISE BA LEC-00005/21

DADOS REFERENTES AO CLIENTE	
Patrocinador:	MEFA CONSULTORIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA
Endereço:	Rua: Rua Juiz David Barrilli, 304, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS/SP.
Contato:	Roberto Varela

DADOS REFERENTES À AMOSTRA	
Identificação do item de ensaio:	MEFA L
Código do item de ensaio (Bioagri):	SAN-0669-01/21
Lote da amostra:	--
Nº da Proposta:	06190/20 - Rev. 2
Data do recebimento do item de ensaio:	01/Jun/2021
Quantidade recebida:	812g
Data de fabricação:	--
Data de validade:	--
Data de início do ensaio:	16/Ago/2021
Data do fim do ensaio:	31/Ago/2021

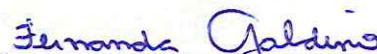
DADOS DE ANÁLISE	
Parâmetro analisado:	Toxicidade aguda para a minhoca <i>Eisenia foetida</i>
Metodologia utilizada:	OECD Guideline for the Testing of Chemicals, nº 207 (OECD, 1984).

Definições	
CL ₅₀ ; 14 dias:	concentração da amostra que causa imobilidade a 50% dos organismos-teste, no período de 14 dias de exposição.
IC (Intervalo de Confiança):	é a incerteza de medição ao nível de 95% de confiança.

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA		
Parâmetro	CL ₅₀ 14 dias (mg/kg)	IC (mg/L)
Toxicidade do aguda do MEFA L para a minhoca <i>Eisenia foetida</i>	> 1000	-

Obs: Os resultados das análises referem-se somente às itens de ensaio analisados.
Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Piracicaba, 17 de Setembro de 2021.


Fernanda Galvão
Responsável Técnico

**BOLETIM DE ANÁLISE
BA LEC-00005/21**

Tabelas

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA

Tabela 1 - Mortalidade Cumulativa das Minhocas no Teste Definitivo Exposta ao Item de Teste, após 7 e 14 dias de incubação.

Concentração nominal * (mg.kg ⁻¹)	Número de minhocas mortas por réplica								Total de mortalidade após 14 dias de exposição
	7 dias de exposição				14 dias de exposição				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	Total
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle água	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Número inicial de minhocas em cada réplica = 10.

CONDIÇÕES DO ENSAIO

Solvente:	Água deionizada	
Tratamento controle:	562 g de solo artificial + 188 mL de água deionizada	
Tratamento amostra:	562 g de solo artificial + 188 mL de solução teste	
Organismo-teste:	<i>Eisenia foetida</i>	
Número de organismo/concentração:	40	
Número de réplicas/concentração:	4	
Intensidade luminosa média:	607 lux	
Temperatura do solo artificial (°C):	Máxima: 21,5	Mínima: 18,0
Peso médio das minhocas no início do Ensaio (mg):	Máximo: 405	Mínimo: 341
Peso médio das minhocas no final do Ensaio (mg):	Máximo: 375	Mínimo: 308

Substância de referência

A CL₅₀ 14 dias** para a substância de referência Cloroacetamida foi 73,20 mg.kg⁻¹, com intervalo de confiança 95% de 63,25 a 84,73 mg.kg⁻¹ de solo artificial. Esta resposta com Cloroacetamida confirma a sensibilidade dos organismos utilizados no presente bioensaio (ABNT, 2014), que está entre 20 e 80 mg.kg⁻¹.

Análise Estatística

Programa estatístico utilizado: Trimmed Spearman-Kärber.

14 dias de exposição.

Boletim de Análise – BA LTA–00042/21

Avaliação da Opacidade e Permeabilidade do Item de Teste **MEFA L** em Córnea Bovina

Dados da Empresa

Empresa: MEFA CONSULTORIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA
Endereço: R. JUIZ DAVID BARRILLI, 304 – SALA 103, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - SP, CEP: 12.246-200

Dados da Amostra:

Nome do Item de Teste:	MEFA L
Aspecto físico:	Líquido
Código Bioagri:	SAN - 0669-01/21
Proposta:	06190/20 - Rev. 2
Data de entrada no laboratório:	01/Jun/2021
Data do início da análise:	04/Ago/2021
Data do término da análise:	04/Out/2021
Metodologia utilizada:	OECD Guideline for Testing of Chemicals. 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 – nº 437. Adopted: June 26 th , 2020, 28p.

RESUMO

Este estudo foi realizado para avaliar o potencial do Item de Teste **MEFA L** de causar sérios danos à córnea isolada dos olhos de bovinos recém-abatidos. O Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) é um ensaio *in vitro* que avalia diretamente os efeitos de substâncias potencialmente irritantes sobre a opacidade e permeabilidade de córneas bovinas recém-obtidas. Após a exposição ao Item de Teste, a opacidade da córnea é medida diretamente com um opacitômetro e permeabilidade da córnea é determinada usando fluoresceína sódica (um corante que geralmente não pode passar pelas células epiteliais da córnea) e medida espectrofotometricamente por meio de alterações na densidade óptica. Ambas as medições são usadas para calcular o Índice de Irritância *in vitro* (IVIS), que podem então ser usados para comparar o potencial de irritação de diferentes substâncias/produtos químicos de teste.

No presente estudo, foram utilizados três córneas para cada grupo experimental e em cada córnea foi aplicado 750 µL do controle negativo, do controle positivo e do Item de Teste na concentração de 10% (m/v), conforme solicitação do patrocinador, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9%. Após a aplicação, as córneas foram mantidas em contato com o Item de Teste, com o controle negativo e positivo por 10 minutos a 32 ± 1°C. Após o período de exposição e lavagem, as córneas foram incubadas por mais 2 horas a 32 ± 1°C e a opacidade foi avaliada. Após este procedimento, as córneas foram incubadas com 1 mL da solução de fluoresceína sódica (4 mg.mL⁻¹) por 90 ± 5 minutos a 32 ± 1°C e a permeabilidade de cada córnea foi avaliada.

O Item de Teste aplicado nas córneas não apresentou alterações macroscopicamente visíveis

A média do valor da opacidade e permeabilidade induzidas pelo Item de Teste foi de 0,206 e -0,006, respectivamente. O valor do Índice de Irritância *in vitro* (IVIS) foi de 0,118.

Portanto, nas condições deste estudo, o Item de Teste **MEFA L** foi classificado de acordo com a UN GHS Classification (OECD TG 437, 2020) como “Sem Categoria”.

Boletim de Análise – BA LTA–00042/21
Avaliação da Opacidade e Permeabilidade do Item de Teste
MEFA L em Córnea Bovina

RESULTADOS ANALÍTICOS

Os resultados da opacidade foram calculados de acordo com as seguintes equações:

Opacidade Líquida da Córnea = Opacidade Final – Opacidade Inicial

Opacidade Corrigida = Opacidade Líquida da Córnea – Média da Opacidade Líquida do grupo Controle Negativo

Os resultados da permeabilidade foram calculados de acordo com as seguintes equações:

DO_{490} Líquida = (Leitura OD_{490} – DO_{490} Branco) x Fator de Diluição (quando houver)

DO_{490} Líquida Corrigida = OD_{490} Líquida – Média DO_{490} Líquida do grupo Controle Negativo

Uma vez que os valores corrigidos de opacidade e permeabilidade (OD_{490}) foram obtidos para cada grupo tratado, os mesmos foram combinados na fórmula descrita abaixo para calcular a graduação da irritação *in vitro* (IVIS):

IVIS = Média da opacidade Corrigida + (15 x Média da OD_{490} Líquida Corrigida)

O valor de IVIS obtido deve ser interpretado de acordo com a tabela abaixo para a realização da classificação da substância teste de acordo com o UN GHS:

IVIS	UN GHS
≤ 3	Não Classificado
$> 3; \leq 55$	A predição não pode ser realizada
> 55	Categoria 1

CONCLUSÃO

O Item de Teste **MEFA L**, quando aplicado em córneas bovinas, obteve um IVIS de 0,118. Portanto, nas condições deste estudo, o Item de Teste **MEFA L** foi classificado de acordo com a UN GHS Classification (OECD TG 437, 2020) como “**Sem Categoria**”.

Boletim de Análise – BA LTA–00042/21

Avaliação da Opacidade e Permeabilidade do Item de Teste
MEFA L em Córnea Bovina

Tabela 1 – Avaliação inicial das córneas.

Grupo	# Córnea	Diâmetro (mm)	Inspeção Visual da córnea	Córnea apta a ser utilizada
Controle Negativo (Solução de cloreto de sódio 0,9%)	16	28,0	0	Sim
	19	26,5	0	Sim
	23	27,5	0	Sim
Controle Positivo (Etanol 100%)	02	27,0	0	Sim
	04	28,0	0	Sim
	05	26,5	0	Sim
MEFA L	20	27,0	0	Sim
	21	27,5	0	Sim
	22	28,0	0	Sim

Legenda para a inspeção visual das córneas: 0: Sem alterações observáveis;

Tabela 2 – Avaliação da opacidade das córneas.

Grupo	Nº da Córnea	Opacidade Inicial	Opacidade Final	Inspeção Visual da córnea ¹	Opacidade Líquida	Média da Opacidade Líquida	Opacidade Corrigida	Média da Opacidade Corrigida ± DP ²
Controle Negativo (Solução de cloreto de sódio 0,9%)	16	5,277	5,673	0	0,396	0,356	0,396	0,356 ± 0,034
	19	4,367	4,703	0	0,336		0,336	
	23	4,536	4,873	0	0,337		0,337	
Controle Positivo (Etanol 100%)	02	3,568	32,225	3A	28,657	27,979	28,301	27,623 ± 0,603
	04	2,284	30,062	3A	27,778		27,421	
	05	1,907	29,410	3A	27,503		27,146	
MEFA L	20	3,103	3,601	0	0,498	0,562	0,141	0,206 ± 0,063
	21	2,070	2,636	0	0,565		0,209	
	22	4,217	4,839	0	0,623		0,266	

Legenda:

0. Sem alterações observáveis

1. Resíduos do Item de Teste

2. Descamação do epitélio

3. Padrão de Opacidade (A) Uniforme (B) Não uniforme

¹ Inspeção visual da córnea após o período de incubação pós-exposição.

² A média da opacidade corrigida para o grupo Controle Negativo representa a média da opacidade líquida.

4. Outros: ---

NA: Não aplicável

DP: Desvio padrão

Boletim de Análise – BA LTA-00042/21

Avaliação da Opacidade e Permeabilidade do Item de Teste
MEFA L em Córnea Bovina

Tabela 3 – Avaliação da permeabilidade das córneas.

Grupo	Nº Córnea	DO ₄₉₀ Rep 1	DO ₄₉₀ Rep 2	Média DO ₄₉₀	Fator de Diluição	DO ₄₉₀ Líquida	Média DO ₄₉₀ Líquida	DO ₄₉₀ Líquida Corrigida	Média da DO ₄₉₀ Líquida Corrigida ± DP
Branco ¹	NA	0,027	0,027	0,027	1	NA	NA	NA	NA
Controle Negativo (Solução de cloreto de sódio 0,9%)	16	0,052	0,050	0,051	1	0,024		0,024	
	19	0,048	0,045	0,047	1	0,020	0,020	0,020	0,020 ± 0,003
	23	0,046	0,043	0,045	1	0,018		0,018	
Controle Positivo (Etanol 100%)	02	0,358	0,343	0,351	5	1,726		1,705	
	04	0,353	0,349	0,351	5	1,728	1,714	1,708	1,694 ± 0,022
	05	0,349	0,337	0,343	5	1,688		1,668	
MEFA L	20	0,036	0,037	0,037	1	0,010		-0,011	
	21	0,049	0,036	0,043	1	0,016	0,015	-0,005	-0,006 ± 0,005
	22	0,056	0,035	0,046	1	0,019		-0,002	

¹ O Branco é representado pelo meio de cultura onde a fluoresceína foi diluída.
NA: Não aplicável. DP: Desvio padrão.

Tabela 4 – Cálculo da graduação da irritação *in vitro* (IVIS).

Grupo	Média da Opacidade Corrigida	Média da DO ₄₉₀ Líquida Corrigida	IVIS
Controle Negativo (Solução de cloreto de sódio 0,9%)	0,356	0,020	0,661
Controle Positivo (Etanol 100%)	27,623	1,694	53,025
MEFA L	0,206	-0,006	0,118

Obs: Os resultados das análises referem-se somente a amostra enviada pelo interessado.
Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Piracicaba, 13 de Outubro de 2021.



Luis Paulo Fava
Responsável Técnico

Título do estudo: Avaliação de Toxicidade Oral Aguda do Item de Teste MEFA L em Ratos

Metodologia: ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.
Guideline for testing of chemicals - Section 4: Health Effects: Acute oral Toxicity - Acute toxic class method - 423. Paris: Adopted: 17 December 2001, p.1-14.

Diretor de estudo: Carlos Alberto Goia

Laboratório Executor: Bioagri Laboratórios Ltda.
Rod. SP 127, Km 24, Fone: (19) 3429-7700 - Fax: (19) 3429-7713
Cx. Postal: 573 e 1239 - CEP: 13412-000
Piracicaba - SP - Brasil
www.merieuxnutrisciences.com; carlos.goia@mxns.com

Patrocinador: MEFA CONSULTORIA, COMERCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE
PRODUTOS QUIMICOS LTDA
Rua: JUIZ DAVID BARRILLI, 304 – SALA 103 – Parque Residencial Aquarius
Fone: (12) 98129-4554
CEP: 12246-200
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - SP - Brasil

Conclusão do Relatório: 17/Set/2021

Relatório do Estudo: RE. 409.0003.21

Declaração de acompanhamento do estudo

O estudo descrito neste Relatório do Estudo foi executado sob minha supervisão, de acordo com os procedimentos descritos no Guideline 423 da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001).

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

Cópia do Relatório do Estudo e todos os dados e observações referentes a este estudo, serão mantidos nos arquivos da Bioagri Laboratórios Ltda., por um período de no mínimo 6 anos.

Os documentos e registros gerados neste estudo serão mantidos nos arquivos da Bioagri Laboratórios Ltda., por um período de 6 anos.



Carlos Alberto Goia
Diretor de Estudo
Fone: (19) 3429-7700

17 Set, 2021
dd mmm aaaa

Relatório do Estudo: RE. 409.0003.21

1. Informações

1.1. Do estudo

Início da fase experimental:	21/Jul/2021
Final da fase experimental:	11/Ago/2021
Conclusão do relatório:	17/Set/2021
Número da proposta:	06190/20 Rev. 2
Corpo técnico:	Diretor de estudo: Carlos Alberto Goia Analistas de laboratório: Danilo Nascimento de Lima Luciana Ometto Segabinazzi

1.2. Do item de teste

Item de teste:	MEFA L
Recebida em:	01/Jun/2021
Código da Bioagri:	SAN-0669-01/21
Aspecto físico:	Líquido
Item de teste enviado por:	MEFA CONSULTORIA, COMERCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUIMICOS LTDA

2. Objetivo

O objetivo é avaliar a toxicidade oral aguda em ratos do item de teste **MEFA L**.

3. Definições

Toxicidade oral aguda: é o efeito adverso que ocorre dentro de um curto período de tempo após a administração oral de uma única dose do item de teste.

Dose: é a quantidade do item de teste administrado ao animal durante o teste, expresso em unidade de peso do item de teste em relação à unidade de peso corpóreo do animal (mg.Kg^{-1}).

DL₅₀ Oral (Dose Letal 50%): é uma única dose do item de teste, que quando administrada por via oral, pode causar a morte de 50% dos animais testados. O valor da DL₅₀ Oral é expresso em unidade de peso do item de teste por unidade de massa de peso corpóreo do animal teste (mg.Kg^{-1}).

Item de 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 OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) nº 423 (2001) e Procedimento Operacional Padrão da Bioagri Laboratórios Ltda., POP-M 1503 (Teste de Toxicidade Oral Aguda em Ratos - (423) Método Clássico OECD, Rev. 08).

4.1. Seleção do sistema-teste

No estudo foram utilizados ratos jovens adultos saudáveis (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com idade de 09 e 08 semanas, lotes: 022/21 e 023/21, com intervalo de peso de $\pm 20\%$, adquiridos da criação ANILAB - Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. Os animais foram utilizados após inspeção e aclimatados nas condições do laboratório por no mínimo 5 dias, conforme POP-M 0700 (Rev. 06) e POP-M 0825 (Rev. 10).

4.1.1. Justificativa da seleção do sistema-teste

O rato é a espécie mais comumente usada para teste de toxicidade oral aguda, e é recomendado por várias agências reguladoras. O rato é um modelo universal para avaliar a toxicidade de várias classes de produtos químicos e para qual existe um grande histórico de dados de base (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. Este estudo está amparado pelo Protocolo nº 005/21, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 24/Fev/2021.

4.2. Preparo do sistema teste

Seis animais fêmeas, nulíparas e não prenhes foram empregadas, usando três animais por tratamento. Os animais selecionados foram randomizados e formados um grupo em cada tratamento, mantendo o peso médio dentro de $\pm 20\%$ calculado separadamente por grupo.

A alimentação foi retirada na véspera da aplicação do item de teste. A ração foi retornada aos animais três horas após a aplicação do item de teste.

Cada animal foi identificado por marca na cauda. Os animais foram numerados com uma caneta apropriada, em ordem crescente. Cada caixa foi identificada com placas metálicas onde constou o código da amostra, número do estudo, data de início e data de término do ensaio, sexo e espécie.

4.3. Condições de alojamento e alimentação dos animais

As condições de higiene e sanitização estão de acordo com o POP-M 0825 (Rev. 10). A temperatura da sala dos animais foi mantida em 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), 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 (Nome Comercial: Socil ratos e camundongos; Marca Neovia Nutrição e saúde animal.) foi oferecida *ad libitum*, supridas em cochos metálicos. Amostras de lotes de ração e de água são regularmente avaliadas por Bioagri Laboratórios Ltda./SP quanto à qualidade microbiológica e microtoxinas que devem estar dentro do padrão de qualidade esperado para ração. Água foi fornecida, *ad libitum*, em garrafas com bico metálico nas gaiolas e a mesma é avaliada quanto à qualidade microbiológica, a mesma atende aos padrões de potabilidade.

4.4. Preparo do Item de Teste

O item de teste foi administrado diluído na proporção de 1 parte do Item de teste para 30 partes de água purificada, conforme diluição de uso recomendada pelo patrocinador, e aplicado com o auxílio de uma cânula metálica, através de gavagem oral.

4.5. Dose utilizada

A dose inicial foi de 2000 mg do item de teste diluído em água purificada / Kg de peso corpóreo. Foram empregados três animais no 1º tratamento. Em consequência dos resultados obtidos, um novo grupo de três animais recebeu novamente a dose de 2000 mg item de teste diluído em água purificada / Kg de peso corpóreo (2º tratamento), para confirmação dos resultados.

4.6. Administração do Item de Teste

O volume do item de teste administrado para cada animal foi calculado de acordo com o respectivo peso corpóreo, determinado no dia do tratamento. A administração foi executada por gavagem, usando uma cânula apropriada fixada a uma seringa. Os animais voltaram a ter acesso ao alimento, *ad libitum*, 3 horas depois da dosagem.

4.7. Peso corpóreo

Os animais foram individualmente pesados antes do item de teste ser administrado (1º dia), no 7º dia após a administração do item de teste, e no final do tratamento (14º dia).

4.8. Observações dos sinais clínicos

Os animais foram observados individualmente após receberem a dose do item de teste, nos primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas (com especial atenção nas primeiras 4 horas), e diariamente, por um período de 14 dias, desde que permanecessem vivos.

Todas as alterações observadas neste período foram sistematicamente registradas, sendo mantidos registros individuais para cada animal.

As alterações clínicas contempladas nas avaliações são: mudanças na pele e pelos, olhos e membranas mucosas, aparelho respiratório, circulatório e sistema nervoso central, com atenção especial para a observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma. Não foram observados sinais clínicos em nenhum dos animais deste estudo bem como não ocorreram mortes durante o estudo.

4.9. Eutanásia dos animais

Os animais deste estudo foram eutanasiados em câmara de CO₂. Após este procedimento, a morte dos animais foi confirmada através do 2º método de eutanásia (deslocamento cervical), conforme POP-M 0824 (Rev. 08).

4.10. Patologia

Todos os animais testados foram submetidos a exame de necropsia conforme POP-M 0841(Rev. 01), sendo registradas para cada animal possíveis alterações patológicas evidenciadas: superfície externa do corpo (pele, pelos e olhos); sistema respiratório (traquéia-artéria e pulmão), sistema circulatório (coração, vasos e artérias), trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e grosso), trato reprodutivo (ovários), sistema urinário (bexiga, rins e ureteres) e outros órgãos como o pâncreas, fígado, baço e cérebro.

5. Resultados

Três animais, fêmeas nulíparas e não prenhas por tratamento foram utilizados no estudo, recebendo individualmente o item de teste (diluído) na dose de 2000 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, conforme Tabela 1.

Relatório do Estudo: RE. 409.0003.21
Tabela 1. Sexo, peso dos animais e volume aplicado do item de teste, correspondendo a dose de 2000 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, durante o período de avaliação.

1º Tratamento						
Número do animal	Sexo	Peso dos animais (g) / período (dias)			Dose (mg.Kg ⁻¹)	Volume aplicado (mL)
		Dia da aplicação (Dia zero)	7º	14º		
1	♀	188,76	193,26	207,47	2000	0,34
2	♀	213,46	235,88	241,38		0,38
3	♀	214,34	238,06	251,34		0,39
2º Tratamento						
Número do animal	Sexo	Peso dos animais (g) / período (dias)			Dose (mg.Kg ⁻¹)	Volume aplicado (mL)
		Dia da aplicação (Dia zero)	7º	14º		
1	♀	195,93	215,12	225,57	2000	0,35
2	♀	206,57	219,63	226,00		0,37
3	♀	196,49	211,76	214,39		0,35

Na Tabela 2 consta o número de animais mortos por dia nas doses avaliadas.

Tabela 2. Animais mortos durante o período de avaliação para cada tratamento.

Tratamentos	Nº de animais	Dose (mg.Kg ⁻¹)	Período de avaliação (dias)														Total de Mortes		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
1	03	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	03	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os animais não apresentaram sintomas ou reações após a aplicação do item de teste.

No exame de necropsia não foram evidenciadas alterações nos sistemas cardio-respiratório, sistema gastro-entérico e anexos, e sistema nervoso central.

Os resultados obtidos com o item de teste foram avaliados de acordo com o esquema de classificação da OECD (2001) (Figura 1, anexo) considerando-se para determinação de DL₅₀, o número de animais mortos e a dose inicialmente administrada do item de teste.

6. Conclusão

Baseado no fluxograma com a dose inicial de 2000 mg.Kg⁻¹ pc, o Item de Teste MEFA L diluído na proporção de 1 parte do Item de teste para 30 partes de água purificada, conforme diluição de uso recomendada pelo patrocinador, foi classificado como categoria 5 (não classificado), de acordo com o GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures). O valor da DL50 oral aguda cut-off para ratos fêmeas testados com o Item de Teste Chlorantraniliprole technical foi estimado em ≥ 5000 mg.Kg⁻¹ pc.

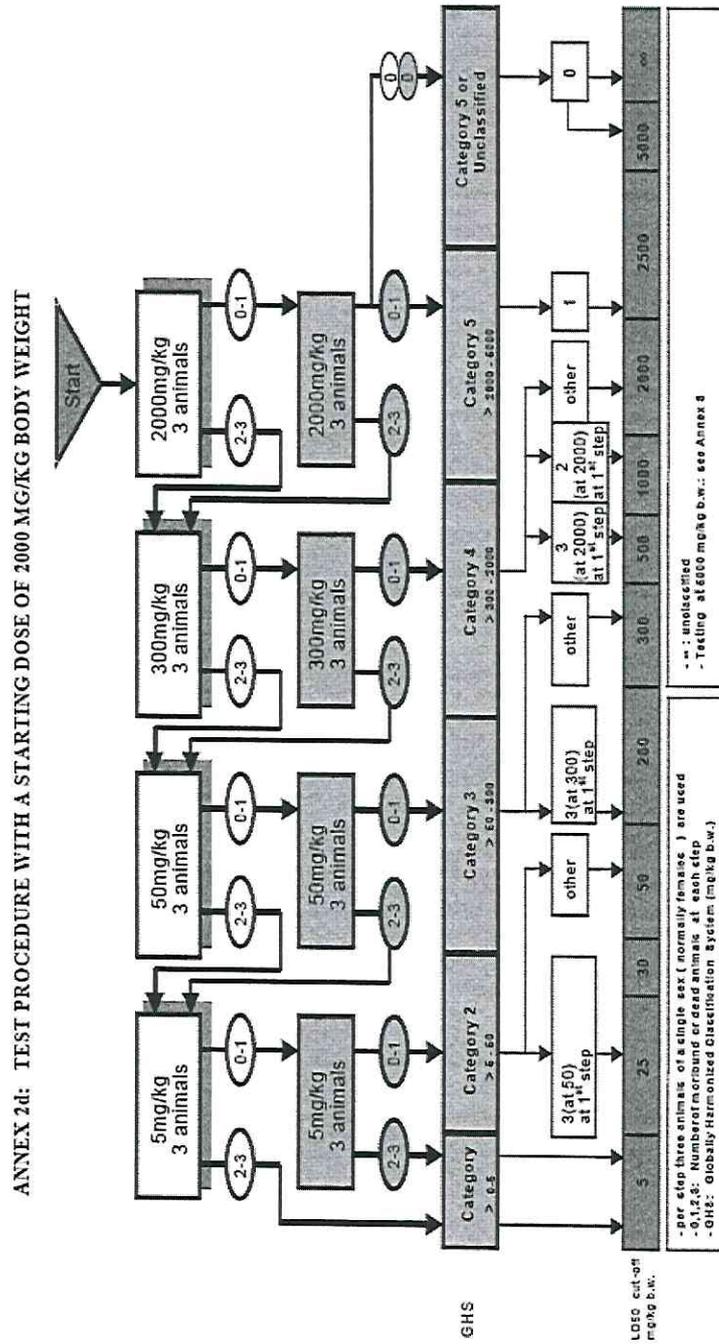
7. Referências Bibliográficas

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for testing of chemicals - Section 4: Health Effects: Acute oral Toxicity - Acute toxic class method - 423.** Paris: Adopted: 17 December 2001, p.1-14.

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

Anexo



Título do estudo: **Avaliação de Toxicidade Cutânea Aguda do Item de Teste MEFA L em Ratos**

Metodologia: Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD Guideline for the Testing of Chemicals - Section 4: Health Effects, 402, 2017

Diretora de estudo: **Andresa Matsui**

Laboratório Executor: **Bioagri Laboratórios Ltda.**
Rod. SP 127, Km 24, Fone: (19) 3429-7700 - Fax: (19) 3429-7713
Cx. Postal: 573 - CEP: 13412-000
Piracicaba - SP - Brasil
www.merieuxnutrisciences.com; andresa.matsui@mxns.com

Patrocinador: **MEFA CONSULTORIA, COMERCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUIMICOS LTDA**
Rua: JUIZ DAVID BARRILLI, 304 – SALA 103 – Parque Residencial Aquarius
CEP: 12246-200
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - SP - Brasil

Conclusão do Relatório: **20/Set/2021**

Data da Revisão: **28/Set/2021**

Relatório do Estudo: RE. 440.0004.21 R1

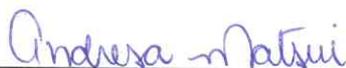
Declaração de acompanhamento do estudo

O estudo descrito neste Relatório do Estudo foi executado sob minha supervisão, de acordo com os procedimentos descritos no Guideline 402 da Organisation for Economic and Co-operation and Development (OECD, 2017).

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

Cópia do Relatório do Estudo e todos os dados e observações referentes a este estudo, serão mantidos nos arquivos da Bioagri Laboratórios Ltda., por um período de no mínimo 6 anos.

Os documentos e registros gerados neste estudo serão mantidos nos arquivos da Bioagri Laboratórios Ltda., por um período de 6 anos.



Andresa Matsui
Diretora de Estudo
Fone: (19) 3429-7700

28 / Set / 2021
dd mmm aaaa

Relatório do Estudo: RE. 440.0004.21 R1

1. Informações

1.1. Do estudo

Início da fase experimental:	30/Ago/2021
Final da fase experimental:	16/Set/2021
Conclusão do relatório:	20/Set/2021
Número da proposta:	06190/20 – Rev. 2
Corpo técnico:	Diretora de estudo: Andresa Matsui Analista de laboratório: Danilo Nascimento de Lima Luciana Ometto Segabinazzi Pessoal: Isabela de Carvalho Assistente administrativo: Daniela Velani

1.2. Do item de teste

Item de teste:	MEFA L
Recebida em:	01/Jun/2021
Código da Bioagri:	SAN-0669-01/21
Aspecto físico:	Líquido
Item de teste enviado por:	MEFA CONSULTORIA, COMERCIO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUIMICOS LTDA

2. Objetivo

O objetivo é avaliar a toxicidade cutânea aguda do item de teste **MEFA L** em ratos.

3. Definições

Toxicidade cutânea aguda: é o efeito adverso que ocorre dentro de um curto período de tempo, logo após a aplicação de uma única dose do item de teste.

Dose: é a quantidade do item de teste aplicada. A dose é expressa em massa do item de teste por peso corpóreo do animal (mg.Kg^{-1}).

DL₅₀ cutânea: é uma dose única estatisticamente derivada de uma substância que pode causar a morte de 50 por cento dos animais tratados quando aplicada à pele. O valor da DL₅₀ cutânea é expresso em termos de peso do item de teste por unidade de peso de animal em teste (mg.Kg^{-1}).

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

4. Material e métodos

O estudo foi delineado para utilizar o menor número de animais, em conformidade com os critérios científicos, a metodologia OECD - *Test Guideline For Testing Chemicals nº 402 (2017)*, e de acordo com relevantes agências regulamentadoras.

4.1. Seleção do sistema-teste

Foram utilizados três ratos, um rato fêmea (definição de dose) e 2 ratos fêmeas (teste definitivo), da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) jovens adultos, saudáveis, as fêmeas eram nulíparas e não prenhas. Idade dos animais: 8 e 9 semanas; Peso corpóreo: 205,60 g a 215,85 g; Procedência: ANILAB - Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda; Lote: 027/21.

Relatório do Estudo: RE. 440.0004.21 R1

4.2. Justificativa da seleção do sistema-teste

O rato é a espécie mais comumente utilizada em testes toxicidade cutânea aguda, e é recomendada por várias agências reguladoras. O rato é um modelo universal para avaliar a toxicidade de várias classes de produtos químicos e para a qual existe uma base de dados históricos.

4.3. 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. Este estudo está amparado pelo Protocolo nº 006/21, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 24/Fev/2021.

4.4. Preparo do sistema-teste

Aproximadamente 24 horas antes da aplicação do item de teste, os animais foram depilados na região dorsal, em uma área equivalente a aproximadamente 10% da superfície total do corpo, utilizando um tosador elétrico, tomando-se cuidado para evitar danos à pele dos animais.

Cada animal foi identificado por marca na cauda. Os animais foram numerados com uma caneta apropriada, em ordem crescente. Cada caixa foi identificada com placas metálicas onde constou o código da amostra, número do estudo, data de início e data de término do estudo, sexo e espécie.

4.5. Condições de alojamento e alimentação dos animais

As condições de higiene e sanitização estão de acordo com o POP-M 0825 (Rev. 09). A temperatura da sala dos animais foi mantida em 22°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 a trocas de ar programadas para 10 a 15/hora.

Ração comercial peletizada (Nome Comercial: Socil Ratos e Camundongos, Marca: Neovia Nutrição e Saúde Animal) foi oferecida *ad libitum*, supridas em cochos metálicos. Amostras de lotes de ração 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 foi fornecida, *ad libitum*, em garrafas com bico metálico nas gaiolas e a mesma é avaliada quanto à qualidade microbiológica, a mesma atende aos padrões de potabilidade.

4.6. Preparo do Item de Teste

O item de teste foi administrado diluído. A diluição foi de uma parte de MEFA L para 30 partes de água: 0,332 gramas de Item de Teste em 10 mL de água purificada.

4.7. Dose utilizada

O item de teste foi administrado diluído na dose de 2000 mg do item de teste diluído/Kg de peso corpóreo.

4.8. Administração do Item de Teste

Com o auxílio de uma seringa o item de teste foi espalhado uniformemente sobre a pele dos animais (na região dorso-lombar), coberta com gaze e fixada com fita hipoalergênica. Os animais permaneceram com a bandagem oclusiva por um período de 24 horas.

4.9. Peso corpóreo

Os animais foram individualmente pesados antes do item de teste ser administrado (1º dia), no 7º dia após a administração do item de teste, e no final do tratamento (14º dia).

4.10. Observações dos sinais clínicos

Os animais foram observados individualmente após receberem a dose do item de teste com especial atenção nas primeiras 4 horas, e diariamente, por um período de 14 dias, desde que permaneçam vivos. Durante o período de 14 dias consecutivos após a administração do item de teste, os animais foram observados quanto ao surgimento de sinais clínicos, como: alterações na pele, pelos, olhos e membranas mucosas; sistema respiratório, sistema circulatório, atividade somatomotora e padrão comportamental, com atenção especial para o aparecimento de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma.

4.11. Eutanásia dos animais

Os animais deste estudo foram eutanasiados em câmara de CO₂. Após este procedimento, a morte dos animais foi confirmada através do 2º método de eutanásia (deslocamento cervical), conforme POP-M 0824 (Rev. 08).

4.12. Patologia

Todos os animais testados foram submetidos a exame de necropsia conforme POP-M 0841 (Rev.01), sendo registradas para cada animal possíveis alterações patológicas evidenciadas: superfície externa do corpo (pele, pêlos e olhos); sistema respiratório (traquéia-artéria e pulmão), sistema circulatório (coração, vasos e artérias), trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e grosso), trato reprodutivo (ovários), sistema urinário (bexiga, rins e ureteres) e outros órgãos como o pâncreas, fígado, baço e cérebro.

5. Resultados

Os animais não apresentaram sintomas ou reações após a aplicação do item de teste, expresso na tabela 2. A Tabela 1 apresenta o peso, sexo dos animais e quantidade de item de teste aplicada durante o período do estudo.

Relatório do Estudo: RE. 440.0004.21 R1

A Tabela 1 apresenta o peso, sexo dos animais e quantidade de item de teste aplicado, durante o período do estudo.

Tabela 1. Peso e sexo dos animais, e volume aplicado na dose de 2000 mg do item de teste/Kg de peso corpóreo. (Definição de dose e teste definitivo).

Sexo	Animal	Peso Corpóreo (g)				Ganho de Peso	Volume de aplicação do Item de Teste (mL)	Data e hora da aplicação	Índice de Mortalidade (%)
		Dia 0	Dia 7	Dia 14					
Definição de dose									
Fêmea	1	206,60	213,48	218,84	13,24	0,37	31/Ago/2021 09h00	0,0	
Sexo	Animal	Peso Corpóreo (g)				Ganho de Peso	Volume de aplicação do Item de Teste (mL)	Data e hora da aplicação	Índice de Mortalidade (%)
		Dia 0	Dia 7	Dia 14					
Teste definitivo									
Fêmea	1	215,85	230,50	237,10	21,25	0,38	02/Set/2021 10:00	0,0	
Fêmea	2	206,78	220,00	231,62	24,84	0,37			

Tabela 2 - Avaliação Clínica dos Animais após exposição ao Item de teste (Definição de dose e teste definitivo).

		Definição de dose																
		Dias																
Sexo	Animal	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		0,5h	2h	5h														
Fêmea	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Legenda: 0. Sem alterações observáveis																		
		Teste definitivo																
		Dias																
Sexo	Animal	0			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		0,5h	2h	5h														
Fêmeas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fêmeas	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Legenda: 0. Sem alterações observáveis																		

A Tabela 3 apresenta o número de animais mortos por dia, durante o período de estudo. Observa-se que não houve mortes, portanto o estudo foi conduzido com uma única 2000 (teste definitivo).

Relatório do Estudo: RE. 440.0004.21 R1

Tabela 3. Número de animais mortos por dia durante o período do estudo (Definição de dose e teste definitivo).

Órgão	Alterações Macroscópicas	
	Fêmea – definição de dose	
	1	
Pele	0	
Pulmões	0	
Rins	0	
Bexiga	0	
Cérebro	0	
Coração	0	
Fígado	0	
Intestinos	0	

Legenda:

0 - Nenhuma alteração observada

Órgão	Alterações Macroscópicas	
	Fêmeas – teste definitivo	
	1	2
Pele	0	0
Pulmões	0	0
Rins	0	0
Bexiga	0	0
Cérebro	0	0
Coração	0	0
Fígado	0	0
Intestinos	0	0

Legenda:

0 - Nenhuma alteração observada

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, o item de teste **MEFA L** apresenta DL₅₀ cutânea superior a 2000 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo.

7. Referências Bibliográficas

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.

OECD (2017). Guideline for Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects: Acute dermal toxicity - 402. Paris: Adopted: October 09th.

Fim do relatório