

ILUSTRÍSSIMA SENHORA JUSSARA, DA COSTA MIRANDA, DD.
PREGOEIRO DA SAMAE - SERVIÇO MUNICIPIO DE GASPAR - SC

Bruna Regina Meis
Prefeitura Municipal de Gaspar
Bruna Regina Meis
Escriturário - Matrícula 12788
15/12/17.

REF.: RECURSO - PREGAO PRESENCIAL 092/2017

Green Tex Química Ltda, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ sob nº 04.973.218/0001-83, com sede na Rua Prefeito Bernardino Antônio de Souza nº 800 - Bairro: Bela Vista, Blumenau, SC, CEP: 89111-118 telefone(s) 47 3041-8480 email:licitacao@greentexquimica.com.br, por seu representante legal Daiana Cassiano Cunhago, infra assinado, vem, tempestivamente, à presença de Vossa Senhoria, interpor

RECURSO ADMINISTRATIVO

em face da decisão que inabilitou a requerente:

“A empresa AVANEX INDÚSTRIA E COMERCIO LTDA questionou a empresa GREEN TEXQUIMICA LTDA referente aos itens do Termo de Referência - 4.6.1 *ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS PARA POLIFOSFATOS* 4.6.1.1 *O produto deverá atender as especificações técnicas estabelecidas da Norma técnica ABNT NBR 15784:2017, aplicada a produtos químicos utilizados no tratamento de água para consumo humano. A empresa CONTRATADA deverá na entrega dos produtos, apresentar laudos de ensaios analíticos específicos para o produto Ortopolifosfato de Sódio exigidos na tabela 02 (análises fluoreto, metais b, radionuclídeos) da Norma técnica ABNT NBR 15784:2017, devendo os valores dos ensaios não ser superiores aos limites ÇIPP - Concentração de Impureza permissível por produto (consultar limites na tabela A.1). e 4.6.5*”

“PAM APRESENTAÇÃO NO PROCESSO LICITATÓRIO - Observação: Para os subitens a e b, deverão ser apresentados juntos com a Declaração, as "Folhas Resumo, dos Laudos em questão, sendo que os Laudos completos serão exigidos em momento oportuno pelo SAMAE de Gaspar. Portanto a Pregoeira decide por desclassificar a empresa GREEN TEX QUIMICA LTDA passando o item 06 para segunda colocada a empresa AVANEX INDÚSTRIA E COMERCIO LTDA.”

A intenção de recurso foi devidamente interposta, conforme consignado em Ata.

I - AUSÊNCIA DE RELATÓRIO FUNDAMENTADO EM CRITÉRIOS TÉCNICO/NORMATIVOS DA ÁREA

1.1. Julgamento não objetivo

Com efeito, apesar da Recorrente ter sido a 1ª classificada, vencedora nos lances de preços, conforme consta em ata, a 2ª. Classificada, "**questionou a empresa GREEN TEX QUÍMICA LTDA.**", quanto aos itens "4.6.1 ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS PARA ORTOPOLIFOSFATO 4.6.11 O produto deverá atender as especificações técnicas estabelecidas da Norma técnica ABNT NBR 15784:2017..."

Ora a Green tex apresentou em sua proposta de preços item 06:

Produto: ORTOPOLIFOSFATO

Marca: GREEN TEX OPF LÍQUIDO

Em seu laudo apresentado está o produto OPF LÍQUIDO.

Caso tenham ou tem dúvidas, por que não promoveram diligências ao laboratório se esta era a questão, visto a inexistência de relatório técnico.

Afinal, a promoção de diligências visando à verificação dos atestados em referência, temos que esta prerrogativa - facultada no art. 43¹ da lei de Licitações, aplicável a qualquer modalidade de licitação - não foi esgotada, por não ter havido qualquer iniciativa do ente público, em visitar a empresa, por exemplo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas sobre a capacidade da mesma em atender ao objeto da licitação, na forma e quantidades previstas.

É que conforme expressam os mais consagrados doutrinadores brasileiros, em que pese a Lei mencionar a "faculdade" em

¹ Art. 43 [...]

§ 3º É facultada à Comissão ou autoridade superior, em qualquer fase da licitação, a promoção de diligência destinada a esclarecer ou a complementar a instrução do processo, vedada a inclusão posterior de documento ou informação que deveria constar originariamente da proposta.

realizar diligências, deve ser interpretada no sentido de atribuição de um dever jurídico.

Assim, para MARÇAL JUSTEN FILHO, " *Em primeiro lugar, deve destacar-se que não existe uma competência discricionária para escolher realizar ou não a diligência. Se os documentos apresentados pelo particular ou as informações nele contidas envolverem pontos obscuros - apurados de ofício ou por provocação de interessados - a diligência será obrigatória. Ou seja, é possível decidir a questão (seja para desclassificar o licitante, seja para reputar superada a questão) mediante uma escolha de mera vontade.*

Portanto, a realização da diligência será obrigatória se houver dúvidas relevantes".² sublinhamos

Na mesma vertente, ADILSON JOSÉ DALLARI, pontua que " *Evidentemente não se pode aceitar que o agente administrativo possa decidir livremente se deseja ou não proceder uma diligência esclarecedora. Se assim fosse, sempre existiria risco de tratamento não igualitário, de condescendência com relação a algum licitante e de rigor em relação a outro. Portanto, a previsão legal estabelece um dever de promover diligências esclarecedoras e não uma faculdade. Esclarecer eventual dúvida quanto à sua proposta é um direito do licitante.*"³

Afim de promover uma decisão fundamentada em análise técnica rigorosa e procedimentalmente adequada à situação (atendendo-se às normas técnicas aplicáveis).

É pacífico o entendimento de que em relação ao cumprimento dos dispositivos do Edital, a Administração deve limitar-se a exigir do licitante exclusivamente o que está previsto em lei, especificando e detalhando o objeto de forma completa e suficiente para não restar dúvida e para que adquira ou contrate o objeto que atenda sua necessidade (preço e qualidade = melhor proposta = proposta mais vantajosa).

Porém, o detalhamento limitar-se-á às características necessárias ao atendimento da demanda administrativa, sem direcionar, favorecer ou beneficiar qualquer interesse particular.

² Comentários à Lei de Licitações e Contratos Administrativos, 12ª Ed. São Paulo: Dialética, 2008, p.556.

³ Aspectos Jurídicos da Licitação, 6ª Ed. São Paulo. Saraiva, 2003, p. 121.

1.2. Julgamento de formalismo exacerbado

Item 4.6.5

“PARA APRESENTAÇÃO NO PROCESSO LICITATÓRIO - Observação: Para os subitens a e b, deverão ser apresentados juntos com a Declaração, as "Folhas Resumo, dos Laudos em questão, sendo que os Laudos completos serão exigidos em momento oportuno pelo SAMAE de Gaspar.”

Dos fatos a empresa Green Tex apresentou as Declarações solicitadas, mas de fato não juntou as “Folhas Resumo”.

Mas informou ao pregoeiro que poderia APRESENTAR TODOS O LAUDOS no dia seguinte.

Ora a GREEN TEX em sua declaração já se compromete a entregar os LAUDOS, anexar as folhas resumo é uma redundância.

Novamente poderia se dispor do artifício da diligência em razão do formalismo.

As Comissões de Licitações, Pregoeiros, que excluem por mero formalismo exacerbado empresas qualificadas e com preço competitivo - no caso o menor preço - instados judicialmente, recorrentemente tem tido que rever suas decisões, por determinação judicial.

Os mais renomados doutrinadores, os Tribunais de Contas dos Estados e da União acompanham tal raciocínio e entendimento.

A fim de exemplificar, sem nos aprofundarmos na discussão doutrinária, buscamos algumas decisões que esclarecem, sem embargo, o entendimento de que o **formalismo exacerbado não pode se sobrepor ao interesse público. E que por si só servem à demonstração de que a decisão da Comissão e do Pregoeiro foi a mais acertada.**

1ª Seção: MS nº 5.869/DF, rel. Ministra LAURITA VAZ:

MANDADO DE SEGURANÇA. ADMINISTRATIVO. LICITAÇÃO. PROPOSTA TÉCNICA. INABILITAÇÃO. ARGÜIÇÃO DE FALTA DE ASSINATURA NO LOCAL PREDETERMINADO. ATO ILEGAL. EXCESSO DE FORMALISMO. PRINCÍPIO DA RAZOABILIDADE.

1. A interpretação dos termos do Edital não pode conduzir a atos que acabem por malferir a própria finalidade do procedimento licitatório, restringindo o número de concorrentes e prejudicando a escolha da melhor proposta.

2. O ato coator foi desproporcional e desarrazoado, mormente tendo em conta que não houve falta de assinatura, pura e simples, mas assinaturas e rubricas fora do local preestabelecido, o que não é suficiente para invalidar a proposta, evidenciando claro excesso de formalismo. Precedentes.

3. Segurança concedida.

(DJ 07/10/2002)

**2ª Turma: REsp nº 1.190.793/SC, rel. Ministro CASTRO MEIRA:
PROCESSUAL CIVIL. VIOLAÇÃO DO ART. 535 DO CPC. OMISSÃO
AFASTADA. LICITAÇÃO. SERVIÇOS DE OXIGENOTERAPIA. AUTORIZAÇÃO
DE FUNCIONAMENTO ANVISA. EDITAL. NÃO-EXIGÊNCIA.**

(...)

2. O acórdão recorrido concluiu que tanto o objeto - contratação de serviços de oxigenoterapia domiciliar-, quanto o edital do certame dispensavam Licença de Funcionamento expedida pela Anvisa, porquanto a licitação não objetivava a "comercialização de equipamentos" que exigiria a autorização do órgão de vigilância, nos termos da lei.

3. Não se deve exigir excesso de formalidades capazes de afastar a real finalidade da licitação, ou seja, a escolha da melhor proposta para a Administração em prol dos administrados.

4. Recurso especial não provido.

(DJe 08/09/2010)

**2ª Turma: RMS nº 15.530/RS, rel. Ministra ELIANA CALMON:
ADMINISTRATIVO - LICITAÇÃO - FORMALIDADES: CONSEQÜÊNCIAS**

1. Repudia-se o formalismo quando é inteiramente desimportante para a configuração do ato.

2. Falta de assinatura nas planilhas de proposta da licitação não invalida o certame, porque rubricadas devidamente.

3. Contrato já celebrado e cumprido por outra empresa concorrente, impossibilitando o desfazimento da licitação, sendo de efeito declaratório o mandado de segurança.

4. Recurso provido.

(DJ 01/12/2003)

4ª Câmara Cível do TJ-ES: Agravo de Instrumento (AG) nº 14119000793, rel. Desembargador MAURÍLIO ALMEIDA DE ABREU:

AGRAVO DE INSTRUMENTO - PRELIMINAR DE PERDA DO OBJETO DO MANDAMUS - REJEITADA - MÉRITO - LICITAÇÃO - MENOR PREÇO - INABILITAÇÃO DO RECORRIDO VENCEDOR - EXCESSO DE FORMALISMO - MALFERIMENTO À ADMINISTRAÇÃO - DECISÃO MANTIDA - RECURSO A QUE SE NEGA PROVIMENTO I - A impetração do mandamus e a concessão da liminar, deram-se ainda dentro do prazo recursal, ou seja, não poderia a autoridade coatora ter considerado encerrado o certame. Preliminar rejeitada. **II** - A inabilitação do recorrido, ao menos numa análise superficial, mostrou-se desarrazoada, medida esta empregada pela municipalidade por apego excessivo ao formalismo, ocasionando, possível malferimento a própria administração, razão pela qual, o entendimento do Magistrado de piso revela-se correto. **III** - Recurso a que se nega provimento.

(DJES de 30/01/2012). (sem grifos no original)

2ª Câmara Cível do TJ-ES: Remessa Ex-officio (REOAC) nº 2609002448-5, relator Desembargador ÁLVARO MANOEL ROSINDO BOURGUIGNON:

MANDADO DE SEGURANÇA - REMESSA NECESSÁRIA - LICITAÇÃO PÚBLICA - INABILITAÇÃO DA EMPRESA PARTICIPANTE - IRREGULARIDADE - APRESENTAÇÃO DE CÓPIA XEROGRÁFICA DE CÓPIA DE DOCUMENTO AUTENTICADO - EXCESSO DE FORMALISMO - REMESSA CONHECIDA - SENTENÇA CONFIRMADA. 1. A Licitação Pública tem por escopo selecionar a proposta mais vantajosa para a Administração, sempre prestigiando os princípios da supremacia do interesse público e da isonomia, de maneira a assegurar oportunidade igual a todos os interessados e possibilitar o comparecimento ao certame ao maior número possível de concorrentes. 2. A apresentação de cópia autenticada extraída de outra cópia autenticada de documento, não é suficiente para a inabilitação do participante do certame licitatório, devendo ser mitigado o excesso de formalismo, com o intuito de preservar a finalidade precípua da licitação. 3. Remessa conhecida. Sentença confirmada.

(DJES de 17/09/2010) (sem grifos no original)

2ª Câmara Cível do TJ-ES: AG nº 24099157943, rel. Desembargador SAMUEL MEIRA BRASIL JUNIOR:

PROCESSUAL CIVIL. LICITAÇÃO. MENOR PREÇO. INABILITAÇÃO. RECURSO PROVIDO. 1. O mandado de segurança não comporta dilação probatória, devendo o impetrante anexar à exordial as provas que possibilitem a análise de sua pretensão (RMS 26.884-SP, Rel. Ministro FELIX FISCHER, QUINTA TURMA, julgado em 19/02/2009, DJe 23/03/2009). 2. A adjudicação do

objeto da licitação somente acarreta a perda superveniente do interesse recursal quando houver esgotamento no cumprimento do contrato, isto é, quando o bem licitado incorporar o patrimônio público. Precedentes do STJ. Não haverá perda superveniente do interesse recursal na hipótese em que o cumprimento do contrato ainda não foi sequer iniciado. 3. **Na licitação pública, o formalismo indevido (desnecessário e inadequado) não pode impedir a proposta mais vantajosa, quando for inteiramente desimportante para a configuração do ato.** 4. O exame da habilitação torna-se inútil e desnecessário, se a licitante apresentou o maior preço. Por sua vez, se a licitante apresentou menor preço, então haverá interesse em se examinar as razões da inabilitação. 5. Examinar as propostas antes dos documentos de habilitação é medida salutar, pois concretiza os princípios constitucionais da eficiência, da moralidade, da probidade administrativa, acelera os procedimentos licitatórios (não faz sentido examinar documentos de habilitação de quem não oferece a proposta mais vantajosa) e permite manifesta transparência no controle dos preços usualmente praticados. 6. O sistema jurídico brasileiro já admite a inversão das fases da licitação e propostas. Com a inversão, a Comissão de Licitação examinará primeiro as propostas comerciais e somente analisará os documentos de habilitação daquela empresa que apresentar o melhor preço. Essa inversão já ocorre no pregão eletrônico, nas hipóteses de Micro ou Pequenas empresas e, atualmente, nas licitações ordinárias em diversos Estados. 7. O §3º do art. 515 do CPC pode ser aplicado, por analogia, ao agravo de instrumento. Desse modo, se a instrução probatória estiver completa ou for desnecessária, o Tribunal pode, em agravo de instrumento, julgar a demanda em primeiro grau, solucionando a controvérsia com resolução do mérito. Nas hipóteses em que a tramitação revela-se desnecessária, inclusive havendo medida adequada que, com menor custo (de tempo e de esforço), mostra-se suficiente para obter o mesmo resultado, então uma eventual dilação gerada pelo atraso na prestação jurisdicional é indevida e contraria o disposto no art. 5º, LXXVIII, da Constituição Federal. 7. Erroneamente, muitos interpretam a Constituição com base nos códigos. Mas não podemos jamais esquecer que a interpretação dos códigos é que deve ser feita à luz da Constituição Federal, que é o fundamento de validade de todo ordenamento jurídico. Assim, a cada modificação na Constituição, surge a necessidade de se revisitar alguns textos normativos e fazer uma releitura das normas infraconstitucionais. Estas devem ser interpretadas de acordo com os princípios (ideais) estabelecidos na própria Constituição. Dessa forma, deve ser emprestada, ao § 3º do art. 515 do CPC, interpretação que concretize em maior grau a garantia da razoável duração do processo, estendendo a sua aplicação ao agravo de

instrumento. 8. Recurso provido. (DJES de 06/09/2009) (sem grifos no original)

4ª Câmara Cível do TJ-MG: Apelação Cível (AC) nº 5874442-89.2009.8.13.0024; rel. Desembargador ALMEIDA MELO:

ADMINISTRATIVO. MANDADO DE SEGURANÇA. LICITAÇÃO. INABILITAÇÃO DE LICITANTE. QUALIFICAÇÃO TÉCNICA. ATENDIMENTO DAS EXIGÊNCIAS DO EDITAL. Em mandado de segurança, verificado que a documentação apresentada atendeu às exigências e ao objetivo do instrumento convocatório, afasta-se o ato administrativo que inabilitou a Impetrante no procedimento licitatório. **A interpretação dos termos do edital de licitação não pode determinar a prática de atos que contrariem a finalidade do procedimento, restrinjam o número de concorrentes e prejudiquem a escolha da melhor proposta.** Recurso não provido.

(DJMG 24/11/2010) (sem grifos no original)

2ª Câmara Cível do TJ-RS: AC nº 7003415948-3, rel. Desembargador ARNO WERLANG:

APELAÇÃO CÍVEL. LICITAÇÃO E CONTRATO ADMINISTRATIVO. MANDADO DE SEGURANÇA. INABILITAÇÃO LICITANTE. ILEGALIDADE CONFIGURADA. PROVA DO DIREITO LÍQUIDO E CERTO. EDITAL. CAPACIDADE TÉCNICA SUPERIOR OU IGUAL A DO OBJETO LICITADO. COMPROVADA. RIGORISMOS MERAMENTE FORMAIS. AFASTAMENTO. Tendo sido preenchidos os requisitos para a habilitação, uma vez que apresentado atestado com qualificação superior à exigida, deve a Impetrante ser considerada habilitada no certame licitatório, até porque, como visto, deve a Administração Pública prezar pelo interesse público acima do privado, razão porque deve garantir ao máximo a competitividade no certame, afastando rigorismos meramente formais. PRELIMINAR REJEITADA, APELAÇÃO DESPROVIDA.

(DJERS 15/12/2010).

8ª Turma Especializada do Tribunal Regional Federal da 2ª Região: AC nº 2009.51.01.024237-6, rel. Desembargador Federal RALDÊNIO BONIFACIO COSTA:

EMENTA: ADMINISTRATIVO - LICITAÇÃO - ABERTURA DE ENVELOPES - EXCESSO DE FORMALISMO - ERRO SANÁVEL - PRINCÍPIO DA RAZOABILIDADE. I- (...). II- Objetivaram as Impetrantes com o mandamus a revisão da decisão administrativa que obstou abertura das propostas de preço que as duas empresas impetrantes equivocadamente lançaram nos envelopes destinados à documentação de habilitação, a fim de assegurar que a parte impetrada considerasse os referidos preços respectivamente propostos sem impor um rigor formal excessivo neste procedimento, eis que o alegado

equivoco levou à desclassificação de ambas na licitação promovida pelo Hospital Central da Aeronáutica (Edital de Pregão nº 012/DIRSA-HCA/2009). **III- Certo que a Administração, em tema de licitação, está vinculada às normas e condições estabelecidas no Edital (Lei n. 8.666/93, art. 41), e, especialmente, ao princípio da legalidade, não deve, contudo, em homenagem ao princípio da razoabilidade, prestigiar de forma exacerbada o rigor formal.** IV- O equivoco cometido pelas Impetrantes de troca de conteúdo dos envelopes com os documentos relativos à habilitação e à proposta de preços não trouxe prejuízos à regularidade da licitação, tratando-se de erro sanável. V- Negado provimento à Remessa Necessária.

(DJ 10/11/2010) (sem grifos no original)

Do TCU -

Acórdão 775/2010 Plenário

A Administração deve, de quando em sempre, buscar a proposta que melhor atenda aos seus interesses. Esse, aliás, é um dos princípios que rege a licitação pública, contudo tal objetivo não deve ser exacerbado a ponto de malferir, de maneira injustificada, outro princípio legal não menos importante, que é o da competitividade do certame.

Acórdão 2407/2006 Plenário

Embora o princípio da economicidade não se encontre formalmente entre aqueles constitucionalmente nominados no caput do art. 37, impõe-se materialmente como um dos vetores essenciais da boa e regular gestão de recursos públicos. Sobre o assunto, faz-se mister trazer à baila a lição do Professor Juarez Freitas (in *O Controle dos Atos Administrativos e os Princípios Fundamentais*, Malheiros Editores, 1997, p. 84/85) quando diz: "No tocante ao princípio da economicidade ou da otimização da ação estatal, urge rememorar que o administrador público está obrigado a obrar tendo como parâmetro o ótimo. Em outro dizer, tem o compromisso indeclinável de encontrar a solução mais

adequada economicamente na gestão da coisa pública. A violação manifesta do princípio dar-se-á quando constatado vício na escolha assaz imperfeita dos meios ou dos parâmetros voltados para a obtenção de determinados fins administrativos."

Parecer nº 15 FECAM

Publicado em 28/03/03 na categoria **Licitação Pública**

(...)

Sem embargo da importância do princípio da vinculação ao edital, a jurisprudência dos nossos tribunais, especialmente do Superior Tribunal de Justiça, vem assinalando que licitantes não devem ser inabilitados ou desclassificados de licitação pública em razão do descumprimento de formalidades que não produzam efeito prático ou que possam ser supridas por informações já disponibilizadas.

(...)

Com efeito, um dos acórdãos mais citados, proferido nos autos do mandado de segurança nº 5.418/DF, relatado pelo Ministro Demócrito Reinaldo, envolve a concorrência pertinente à telefonia da chamada Banda B. À época, o Consórcio TESS, um dos licitantes, foi desclassificado da licitação porque grafou sua proposta somente em algarismos, sem a indicação por extenso. Perceba-se que, in casu, se tratava, efetivamente, de mera irregularidade, sem qualquer repercussão prática, absolutamente sanável. Em razão disso, os ministros do Superior Tribunal de Justiça resolveram conceder a segurança, reformando a decisão que havia desclassificado o referido Consórcio.

Na ementa do supracitado acórdão lê-se o seguinte: "Consoante ensinam os juristas, o princípio da vinculação ao Edital não é absoluto, de tal forma que impeça o Judiciário de interpretar-lhe, buscando-lhe o sentido e a compreensão e escoimando-o de cláusulas desnecessárias ou que extrapolem os ditames da lei de regência e cujo excessivo

rigor possa afastar, da concorrência, possíveis proponentes, ou que o transmude de um instrumento de defesa do interesse público em conjunto de regras prejudiciais ao que, com ele, objetiva a Administração (...) O formalismo no procedimento licitatório não significa que se possa desclassificar propostas eivadas de simples omissões ou defeitos irrelevantes." (grifo acrescido)

Outro acórdão do Superior Tribunal de Justiça, também relatado pelo Ministro Demócrito Reinaldo, diz respeito a mandado de segurança impetrado pela Rádio FM Miraguai Ltda (nº 5.597/DF), que foi inabilitada em licitação pública por não constar assinatura do gerente da empresa no balanço de abertura, no balanço patrimonial e no índice de solvência, conquanto os referidos documentos tivessem sido assinados por contador regularmente habilitado, como exige a lei, e, posteriormente, ratificados. Note-se que, mais uma vez, se tratava, realmente, de mera formalidade, sem conseqüências práticas, por efeito do que os ministros do Superior Tribunal de Justiça concederam a segurança, determinando a habilitação da impetrante.

Aliás, também o acórdão prolatado nos autos do mandado de segurança nº 5.361, relatado pelo Ministro José Delgado, considera excessiva a exigência de que o balanço seja assinado pelo sócio gerente, contentando-se com a aposição do contador.

Acrescenta-se decisão do Superior Tribunal de Justiça, relatada pelo Ministro Demócrito Reinaldo, proferida nos autos do mandado de segurança de nº 5647, que concedeu a ordem para o efeito de reformar decisão administrativa que havia inabilitado licitante pura e simplesmente porque a certidão de inscrição municipal apresentada por ela, absolutamente perfeita e válida, não estava numerada, como exigia o edital. Salta aos olhos, mais uma vez, que a inabilitação da impetrante havia-se dado por mera formalidade, que não afetava em nada o conteúdo do documento que se exigia. (...)"

A lei incentiva o caráter competitivo com o aumento do universo de competidores, propiciando, desta forma, a obtenção da proposta mais vantajosa à Administração.

Não estamos aqui falando de qualquer empresa, **mas daquela que apresentou a menor proposta (exequível)** e certamente seria a proposta mais vantajosa para o ente licitante, reunindo qualidade e preço, que é o objetivo da licitação, nos exatos termos do que disciplina o art.3º, da lei nº 8.666/93 ⁴ e consagrado pela doutrina.

A Green Tex foi classificada com o valor total de **R\$ 34.930,00.**

Após ser desclassificada a nova empresa foi classificada com o valor total de **R\$ 63.000,00. (80,36% MAIOR)**

Esta diferença de R\$ 28.070,00 É BASTANTE CONSIDERÁVEL PARA SER DESCONSIDERADA.

É nessa análise que o princípio da **economicidade** se revela, auxiliando a aplicação dos recursos públicos com zelo e eficiência.

Decisão do TC/SP reconheceu caráter irregular em contratação que não observou o princípio da economicidade **(TC/SP Protocolo nº 5.150/026/93, DOE de 05.10.1995).**

Ante o exposto, requer:

- a) Vossa Senhoria **reconsiderar** a decisão recorrida, constante da Ata da sessão do dia 12/12/2017, para **habilitar** a licitante recorrente **Green Tex Química Ltda,** em respeito aos princípios que regem a Administração Pública, conforme argumentado, notadamente o da economicidade e da eficiência e efetividade, já que a proposta da recorrente foi a de MUITO MENOR preço.

Pede deferimento

Blumenau, p/ Gaspar, em 14/12/2017.

(Segue anexo laudos completos)


Isadora Gassiano Cunha

⁴ Art. 3º. A licitação destina-se a garantir a observância do princípio constitucional da isonomia e a selecionar a proposta mais vantajosa para a Administração e será processada e julgada em estrita conformidade com os princípios básicos da legalidade, da impessoalidade, da moralidade, da igualdade, da publicidade, da probidade administrativa, da vinculação ao instrumento convocatório, do julgamento objetivo e dos que lhe são correlatos. (destacamos)

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins de que o produto dispõe de Laudo do teste de Toxicidade Oral Subcrônica de (90 dias) e, apresentaremos a esta autarquia quando solicitado ou para fins de esclarecimentos;

GASPAR, em 11 de dezembro de 2017


Daiana Cassiano Cunhago
044.725.889-35

04 973 218/0001-83

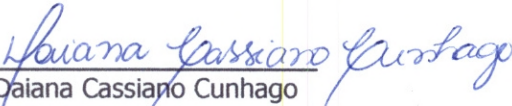
GREENTEX QUÍMICA LTDA

RUA GENI SPINNER, 45 GALPÃO
BELA VISTA - 89110-000
GASPAR - SC

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins de que o produto dispõe de Laudos de Análise de Toxicidade, emitidos por órgão de grande notoriedade e de reconhecida capacidade tecnológica baseado nos testes de DL 50 oral, DL 50 Dermal e Mutagenicidade (Micronúcleo e Ames), que comprovam que o produto não é tóxico a dosagem de 10 ppm e, apresentaremos a esta autarquia quando solicitado ou para fins de esclarecimentos;

GASPAR, em 11 de dezembro de 2017


Daiana Cassiano Cunhago
044.725.889-35

☐ 04 973 218/0001-83 ☐

GREENTEX QUÍMICA LTDA

RUA GENI SPINNER, 45 GALPÃO
BELA VISTA - 89110-000
GASPAR - SC

PROPOSTA DE PREÇO

Razão Social: GREEN TEX QUÍMICA LTDA

CNPJ: 04.973.218/0001-83

Endereço: RUA PREFEITO BERNARDINO DE SOUZA, Nº 800 – BELA VISTA

Cidade/UF: SC CEP: 89111-118

Telefone(s): E-mail(s): 47 3018-0800

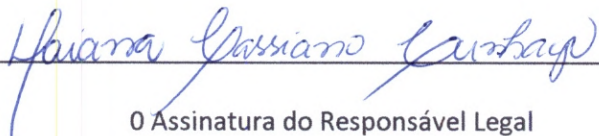
Item	Unid. de Medida Descrição dos Produtos	Quantidade	Valor Unitário Máximo	Valor Unitário Cotado	MARCA	VALOR TOTAL
06	KG (Base seca) Ortopolifosfato.	7.000	R\$ 14,80	R\$ 4,99	Green Tex OPF Líquido	R\$ 34.930,00

a) Nos preços propostos estão inclusos os encargos trabalhistas, todos os equipamentos, instrumentos, ferramentas e máquinas, transporte, salários, carga tributária, alvará, taxas municipais, estaduais e federais, as despesas indiretas, lucro bruto do licitante e os demais custos, necessários para a execução integral do objeto constante no Edital do Pregão Presencial 92/2017 e seus anexos;

b) O prazo de validade da proposta é de 60 (sessenta) dias, a contar da entrega dos Envelopes;

c) Concordamos integralmente com todos os termos do Edital e que executaremos o objeto da presente licitação conforme estipulado no edital.

d) Os preços, válidos na data de abertura da licitação, serão fixos e irrevogáveis.


O Assinatura do Responsável Legal**Dados para Depósito Bancário:**

Banco: do Brasil

Agência: 0095 Dígito: 7

Conta:15.120 Dígito: 3

Dados do Responsável pela Assinatura do Contrato:

Nome: Jan Buhr

CPF: 828.158.289-87

RG: 2.610.873-9

04 973 218/0001-83

GREENTEX QUIMICA LTDA

RUA GENI SPINNER, 45 GALPÃO

BELA VISTA - 89110-000

GASPAR - SC

Atestado de Fornecimento Parcial

Atestamos para os devidos fins, que a empresa **Green Tex Química Ltda.**, situada em Gapar – Santa Catarina, CNPJ 04.973.218/0001-83, firmou ATA de Registro de Preço nº 063/2016 com vigência de 04/10/2016 a 04/10/2017 com entrega de 36 Toneladas para o **DAE – DEPARTAMENTO DE ÁGUA E ESGOTO DE BAURU**, o produto ORTOPOLIFOSFATO em base seca, entregue em solução aquosa, de Poli e ortofosfato, utilizado para o tratamento de água para consumo humano.

Outrossim, informamos que o fornecimento foi prestado a contento e satisfatoriamente.

Portanto, a referida empresa demonstra idoneidade e capacidade técnica, não havendo em nossos registros nada que a desabone.

Bauru, 25 de Setembro de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eric-Édir Fabris', is written over a circular stamp. The signature is fluid and somewhat stylized.

Eric-Édir Fabris
Presidente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Camilla Zanatta Gonçalves', is written over a circular stamp. The signature is in a cursive style.

Camilla Zanatta Gonçalves

SAST



Título do Estudo

Avaliação do potencial mutagênico da substância teste
GREENTEX OPF
através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
(Teste de Ames)

Responsável Técnica

Cintia Kaori Miyaji

Estudo Iniciado

31/Out/2013

Relatório Final

11/Dez/2013

Laboratório Executor

BIOAGRI Laboratórios Ltda.
Rod. SP 127, km 24
Telefone: +55 (19) 3429-7700 – Fax: +55 (19) 3429-7713
Caixa Postal 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba/SP - Brasil
www.bioagri.com.br
E-mail: bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador

GREEN TEX QUIMICA LTDA
Rua Geni Spiner, 45 - Bela Vista
Gaspar - SC
CEP: 89-110-000
Telefone: (47) 3397-2183

Estudo #

RF-401-0004/13

Declaração de acompanhamento e aprovação do estudo

Eu, abaixo assinado, declaro que o estudo descrito neste relatório foi executado segundo os procedimentos descritos no Guidelines for the Testing of Chemicals, Nº 471 for Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 1997).

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

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


Cintia Kaori Miyaji
Responsável Técnica
Fone: (19) 3429-7700

11 / Dez / 2013
dd Mmm aaaa

Índice

	Página #
Declaração de acompanhamento e aprovação do estudo.....	2
Índice	3
Resumo	5
1. Informações Gerais.....	5
2. Equipe Técnica	5
3. Introdução.....	6
4. Objetivo.....	6
5. Definições.....	7
5.1. Mutação rfa.....	7
5.2. Mutação uvrB.....	7
5.3. Mutações por Substituição de Pares de Base.....	7
5.4. Mutações por Deslocamento do Quadro de Leitura ("frameshift").....	7
5.5. Plasmídio pKM101.....	7
5.6. Plasmídio pAQ1.....	7
5.7. his ⁻	7
5.8. S9.....	7
5.9. Ap ^R	7
5.10. Tt ^R	7
6. Material e Métodos.....	7
6.1. Informações Referentes à Substância Teste	7
6.2. Informações Referentes à Substância de Referência	8
6.3. Preparo de soluções.....	9
6.3.1. Preparo da Substância Teste.....	9
6.3.1.1. Seleção Do Solvente da Substância teste.....	10
6.3.1.2. Teste de esterilidade da amostra	10
6.3.2. Preparo do Ativador Metabólico – Mistura S9	10
6.4. Sistema Teste.....	11
6.4.1. Manutenção do Sistema Teste.....	11
6.4.2. Preparo dos Inóculos das Culturas de Salmonella typhimurium	12
6.5. Procedimento Experimental.....	12
6.5.1. Incorporação em Placa	13
6.6. Estatística	14
7. Resultados.....	14
7.1. Teste Preliminar.....	14
7.2. Teste Principal.....	15
8. Conclusão.....	15
9. Referências Bibliográficas.....	16

Tabela 1 – Cepas que detectam agentes mutagênicos que causam mutação por deslocamento do quadro de leitura do ADN das bactérias e respectivos dados históricos das reversões espontâneas do laboratório.....	17
Tabela 2 – Cepas que detectam agentes mutagênicos que causam mutação por substituição de pares de bases do ADN das bactérias e respectivos dados históricos das reversões espontâneas do laboratório.....	17
Tabela 3 – Resultados do teste preliminar com as cepas TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535 na presença e ausência de ativador metabólico.....	18
Tabela 4 – Resultados da verificação do lote 3090 de ativador metabólico com o benzo(a)pireno com a cepa TA 98.....	19
Apêndice 01 – Análise Estatística com a Cepa TA 97a sem S9.....	20
Apêndice 02 – Análise Estatística com a Cepa TA 98 sem S9.....	21
Apêndice 03 – Análise Estatística com a Cepa TA 100 sem S9.....	22
Apêndice 04 – Análise Estatística com a Cepa TA 102 sem S9.....	23
Apêndice 05 – Análise Estatística com a Cepa TA 1535 sem S9.....	24
Apêndice 06 – Análise Estatística com a Cepa TA 97a com S9.....	25
Apêndice 07 – Análise Estatística com a Cepa TA 98 com S9.....	26
Apêndice 08 – Análise Estatística com a Cepa TA 100 com S9.....	27
Apêndice 09 – Análise Estatística com a Cepa TA 102 com S9.....	28
Apêndice 10 – Análise Estatística com a Cepa TA 1535 com S9.....	29
Anexo 01 – Certificado do ativador metabólico.....	30

Resumo

O Teste de Ames, um ensaio mutagênico em células procariontes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, foi conduzido com a substância teste GREENTEX OPF visando estudar possível efeito mutagênico nas cepas TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535. O teste foi realizado com e sem ativação metabólica. A substância teste foi testada em oito concentrações no teste preliminar: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹ e em seis concentrações no teste definitivo: 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 mg placa⁻¹ para a cepa TA 102 sem ativador metabólico; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg placa⁻¹ para a cepa TA 97a com ativador metabólico, 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 97a sem ativador metabólico e TA 1535 com ativador metabólico; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mg placa⁻¹ para a cepa TA 98 sem ativador metabólico e 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 100 e TA 1535 sem ativador metabólico e TA 98, TA 100 e TA 102 com ativador metabólico. Os controles positivos apresentaram os aumentos esperados nos números de revertentes. O controle negativo manteve o número de revertentes espontâneos dentro da taxa de reversão para cada uma das cepas. A substância teste GREENTEX OPF não produziu um aumento no número de revertentes nos ensaios com e sem ativador metabólico, em nenhuma das cepas e concentrações estudadas quando comparadas ao número de revertentes espontâneos das culturas padrão tratadas com o solvente (água) usando o programa estatístico Salmonel Assay. Esses resultados indicam que, nas condições do ensaio, a substância teste GREENTEX OPF não apresentou potencial de atividade mutagênica nas cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

1. Informações Gerais

Data do Início do Experimento:	31/Out/2013
Data do Término do Experimento:	25/Nov/2013
Data do Término do Estudo:	10/Dez/2013

2. Equipe Técnica

Responsável Técnica:	Cintia Kaori Miyaji
Pesquisadora:	Ana Paula Vitti Dorelli Daniela Ferraz Menezes
Técnicos de laboratório:	Beatriz Martini Fernanda Regina Tulho de Lima Jacqueline Torres Silveira de Sá

3. Introdução

O Teste de Ames foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames (AMES et al., 1975) e revisado por MARON & AMES (1983). CLAXTON et al. (1987) contribuíram com as principais orientações e recomendações na condução desse ensaio assim como, na interpretação dos resultados. GATEHOUSE et al. (1994) resumem as principais recomendações de consenso internacional na realização desse ensaio.

O teste emprega um conjunto de cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, derivadas da linhagem parental LT2 auxotrófica para histidina (*his*⁻). Cada cepa padrão contém um tipo diferente de mutação no operon da histidina. Além da mutação quanto a histidina, as cepas padrões têm outras mutações que aumentam grandemente sua habilidade em detectar mutagênicos. A mutação do tipo *rfa* torna a célula mais permeável a moléculas grandes; a mutação por *uvrB* confere maior sensibilidade das células à luz ultravioleta; as cepas com plasmídeo pKM101 – Fator R e pAQ1 são mais sensíveis aos diferentes mutágenos e têm maior resistência à ampicilina e tetraciclina, respectivamente. Essas cepas são revertidas por diferentes mecanismos e a resposta aos mutágenos depende do modo de interação da substância em teste com o ADN bacteriano. As reversões ocorrem especialmente por mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura (“frameshift”) e ou por substituição de pares de base no ADN (MARON & AMES, 1983).

Essas cepas são incapazes de crescer em meio de cultura sem histidina a não ser que mutações estabeleçam reversões que restaurem a síntese da histidina. A frequência de reversão é medida pela contagem de unidades formadoras de colônias de uma população de células que foi exposta a uma substância mutagênica. Além dos controles negativos (solvente empregado na solubilização da substância em teste) e positivos (substâncias mutagênicas específicas para as mutações presentes em cada cepa padrão), inclui-se neste teste um sistema de ativação metabólica (mistura S9) para detecção de promutágenos ou mutágenos indiretos (MARON & AMES, 1983). Esses ativadores adicionais, tal como a mistura S9, são preparados de uma mistura de enzimas de mamíferos necessárias na detecção de certas substâncias que tornam-se mutagênicas somente após metabolização por determinadas vias não comuns às bactérias (EATON et al., 1995).

O número de revertentes por dose da substância em teste é calculado, para cada cepa e os resultados também são analisados por métodos estatísticos.

4. Objetivo

O teste tem por objetivo avaliar o potencial da substância teste GREENTEX OPF em induzir mutações no genoma de cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium através da reversão da mutação *his*⁻ para *his*⁺, com e sem um sistema de ativação metabólica. A partir deste momento o nome *Salmonella enterica* serovar Typhimurium passa a ser descrito como *Salmonella* Typhimurium, segundo Su, L.H and Chiu, C.H. (2007).

5. Definições

5.1. **Mutação rfa**

A mutação rfa induz modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana, levando a uma maior permeabilidade às moléculas grandes.

5.2. **Mutação uvrB**

A mutação uvrB é causada por deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisão, que impede a bactéria de reparar alguns tipos de danos ao ADN, conseqüentemente torna a célula mais sensível a agentes mutagênicos; por motivos técnicos essa mutação estendeu-se ao gene da biotina determinando também necessidade a esta vitamina como fator de crescimento.

5.5. **Mutações por Substituição de Pares de Base**

Mutações por substituição de pares de base são mutações causadas por agentes mutagênicos que promovem mudança de nucleotídeos, pela troca ou substituição, na molécula de ADN. No ensaio de reversão esta mudança pode ocorrer no sítio de mutação original ou em um segundo sítio do cromossomo.

5.4. **Mutações por Deslocamento do Quadro de Leitura (“frameshift”)**

Mutações por deslocamento do quadro de leitura (“frameshift”) são mutações que ocorrem por ação de agentes mutagênicos que levam a perdas ou adições de uma ou mais bases na molécula de ADN.

5.5. **Plasmídio pKM101**

O plasmídio pKM101 é um plasmídio que contém um gene para resistência à ampicilina, responsável pelo aumento do sistema de reparo do tipo “error prone” (passível de erro), conferindo à bactéria maior sensibilidade a agentes mutagênicos.

5.6. **Plasmídio pAQ1**

O plasmídio pAQ1 é um plasmídio multicópia que tem um gene para resistência à tetraciclina.

5.7. **his⁻**

Cepa auxotrófica para histidina

5.8. **S9**

Sistema de ativação metabólica para detecção de agentes promutagênicos ou agentes mutagênicos indiretos.

5.9. **Ap^R**

Cepa resistente a ampicilina.

5.10. **Tt^R**

Cepa resistente a tetraciclina.

6. Material e Métodos

6.1. **Informações Referentes à Substância Teste**

Amostra identificada como:	GREENTEX OPF
Data da entrada da amostra:	15/Out/2013
Código BIOAGRI da amostra:	SAN-2337/13
Ingrediente ativo:	FOSFATO
Lote:	12973
Data de fabricação:	10/Out/2013
Prazo de validade:	10/Out/2015

Composição declarada: HEXAMETAFOSFATO DE SODIO 75%
FOSFATO MONOSSODICO ANIDRO 25%
Proposta nº: 00204/13
Solicitado pela empresa: GREENTEX QUIMICA LTDA

6.2. Informações Referentes à Substância de Referência

Controles positivos cepa-específicos utilizados para os testes sem sistema de ativação metabólica:

Substância de referência:	Azida sódica
Número do lote:	0001453190
Número do CAS:	26628-22-8
Data de validade:	14/Fev/2014 (solução do teste preliminar) 07/Mai/2014 (solução do teste definitivo)
Concentração declarada:	99%
Concentração utilizada:	1 mg mL ⁻¹ (0,05 mg placa ⁻¹)
Fabricante:	Sigma/Aldrich
Condições de armazenamento:	Temperatura ambiente
Solvente:	Água purificada
Cepas padrão:	TA 100 e TA 1535
Substância de referência:	2-Nitrofluoreno
Número do lote:	S43858-369 (solução do teste preliminar)
Fabricante:	Sigma-Aldrich (solução do teste preliminar)
Número do lote:	11202TF (solução do teste definitivo)
Fabricante:	AccuStandard (solução do teste definitivo)
Número do CAS:	607-57-8
Data de validade:	02/Abr/2014 (solução do teste preliminar) 14/Abr/2014 (solução do teste definitivo)
Concentração declarada:	98%
Concentração utilizada:	1 mg mL ⁻¹ (0,05 mg placa ⁻¹)
Condições de armazenamento:	Temperatura ambiente
Solvente:	DMSO
Cepas padrão:	TA 98
Substância de referência:	9-Aminoacridina
Número do lote:	106F06681
Número do CAS:	90-45-9
Data de validade:	04/Mar/2014 (solução do teste preliminar) 06/Mai/2014 (solução do teste definitivo)
Concentração declarada:	98%
Concentração utilizada:	1 mg mL ⁻¹ (0,05 mg placa ⁻¹)
Fabricante:	Sigma-Aldrich
Condições de armazenamento:	Temperatura ambiente
Solvente:	álcool etílico
Cepas padrão:	TA 97a

Substância de referência:	Hidroperóxido cumena
Número do lote:	S84423-269
Número do CAS:	80-15-9
Data de validade:	04/Mar/2014
Concentração declarada:	aproximadamente 80%
Concentração utilizada:	1 mg mL ⁻¹ (0,1 mg placa ⁻¹)
Fabricante:	Sigma-Aldrich
Condições de armazenamento:	Temperatura ambiente
Solvente:	Água purificada
Cepas padrão:	TA 102

Para os testes com sistema de ativação metabólica, a substância de referência utilizada como controle positivo, com as cepas padrão TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535, foi:

Substância de referência:	2-Aminoantraceno
Número do lote:	STBB1901V
Número do CAS:	613-13-8
Data de validade:	02/Jan/2014 (solução do teste preliminar) 23/Abr/2014 (solução do teste definitivo)
Concentração declarada:	96%
Concentração utilizada:	1 mg mL ⁻¹ (0,05 mg placa ⁻¹)
Fabricante:	Sigma-Aldrich
Condições de armazenamento:	Temperatura ambiente
Solvente:	DMSO

O 2-aminoantraceno foi utilizado como único indicador da eficácia da mistura S-9, entretanto o lote de S9 foi verificado com o benzo(a)pireno, que é um agente mutagênico que também requer ativação metabólica por enzimas microsossomais.

6.3. Preparo de soluções

6.3.1. Preparo da Substância Teste

A solução estoque empregada nos testes preliminar e definitivo foi obtida pela homogeneização de 1,25 gramas da substância teste em balão volumétrico com volume final 10,0 mL de solvente (água). A partir da primeira solução estoque outras quatro diluições na razão 1:10, foram preparadas para se obter as concentrações apropriadas em placa, essas soluções foram preparadas imediatamente antes da aplicação. As concentrações finais empregadas em placa foram: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹, no teste preliminar e 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 mg placa⁻¹ para a cepa TA 102 sem ativador metabólico, 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg placa⁻¹ para a cepa TA 97a com ativador metabólico, 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 97a sem ativador metabólico e TA 1535 com ativador metabólico, 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mg placa⁻¹ para a cepa TA 98 sem ativador metabólico e 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 100 e TA 1535 sem ativador metabólico e TA 98, TA 100 e TA 102 com ativador metabólico no teste definitivo.

6.3.1.1. Seleção Do Solvente da Substância teste

A solubilidade da substância teste foi testada em água e a olho nu a substância teste ficou bem solubilizada, dessa forma a água foi o solvente selecionado.

6.3.1.2. Teste de esterilidade da amostra

A amostra diluída foi estriada em placa de ágar nutriente e incubada por 48h a 37°C. Não foi observado nenhum crescimento, portanto a amostra foi utilizada no estudo.

6.3.2. Preparo do Ativador Metabólico – Mistura S9

A mistura de S9 – liofilizado da fração microsomal de fígado de rato ativado com Aroclor 1254 (Moltax - Molecular Toxicology Inc., Annapolis, MD, U.S.A) adicionada de cofatores (NADP e soluções de cloreto de potássio, cloreto de magnésio hexahidratado, tampão fosfato e glicose-6-fosfato) - foi preparada de acordo com MARON & AMES (1983), imediatamente antes do início do teste. A mistura S9 foi mantida em banho de gelo por não mais que cinco horas. Todos os cuidados de assepsia durante a preparação e manipulação da mistura S9 foram tomados. Em paralelo conduziu-se o teste de esterilidade de cada solução e da fração S9 utilizada.

Antes da utilização de cada lote de S9, deve-se testar sua capacidade de metabolizar uma substância através de um ensaio prévio com um controle positivo que cause reversão mediante emprego da fração S9. Pode-se realizar este teste com qualquer uma das cepas de *Salmonella* Typhimurium disponíveis e substâncias de referência. No caso do uso de 2-aminoantraceno, deve-se validar a taxa reversão espontânea também com o benzo(a)pireno, que é um agente mutagênico que necessita de metabolização.

Cada novo lote deve ser checado quanto à esterilidade empregando-se um frasco de S9, preparado com 2 mL de água purificada esterilizada. Assim, plaqueia-se 0,1 mL em placa com meio ágar nutriente e incuba-se a 37°C (± 1) por 72 horas. Após esse período, avalia-se a presença de colônias. O lote é considerado estéril se não houver crescimento na placa.

O teste foi realizado com 2 replicatas com e sem a mistura S9 em 4 concentrações cada, seguindo a metodologia de incorporação em placas como utilizado no teste.

A mistura de S9 (5%) fração tecidual, e cofatores, foram preparadas, para cada 40 mL, como se segue:

Fração S9	2,00 mL
NADP (100 mM)	1,60 mL
Glicose-6-fosfato (100 mM)	0,20 mL
MgCl ₂ / KCl	0,80 mL
Tampão fosfato (pH 7,4, 200 mM)	20,00 mL
Água destilada	15,40 mL
	=====
	40,00 mL

6.4. Sistema Teste

As Tabelas 1 e 2 apresentam as características genéticas, dados históricos dos controles negativo, solvente e positivo do laboratório para cada uma das cepas de *Salmonella* Typhimurium. As cepas utilizadas neste estudo devem produzir contagem de colônias espontâneas dentro da frequência esperada no laboratório e preferencialmente dentro da taxa descrita na literatura (OECD nº 471, 1997). Os dados históricos da literatura são utilizados para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos no laboratório, e o tratamento estatístico dos dados históricos e do laboratório deve ser um guia e não uma regra (LOVELL, 1997). Neste contexto, os dados obtidos neste estudo que possam estar acima e abaixo dos dados históricos devem ser julgados com cuidado, considerando o significado biológico.

6.4.1. Manutenção do Sistema Teste

As cepas foram adquiridas da Moltox Toxicology, Inc. e estas são geralmente fornecidas adsorvidas em discos de papel, contidas em sacos plásticos com pequena quantidade de meio de cultura. No recebimento são reativadas e em seguida são preparados os estoques permanentes adicionados de 5% de DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotetor, onde são mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido (-196°C). A partir do estoque permanente, as placas Master são preparadas para uso rotineiro, mantidas sob refrigeração por não mais de dois meses.

Os genótipos de cada cepa são sistematicamente confirmados imediatamente após o recebimento das culturas, quando se prepara uma cultura a partir do estoque permanente ou quando quaisquer características genotípicas não se encontram em acordo com o controle do laboratório.

A verificação das características genéticas de cada cepa é testada a partir das culturas (pernoite) que deram origem à placa Master ou das culturas de cepas novas, quanto ao número de revertentes espontâneos, dependência para histidina, presença de mutação *rfa* através da sensibilidade ao cristal violeta, presença de deleção *uvrB* verificando-se a sensibilidade ao ultra violeta, presença dos plasmídios *pKM101* e *pAQ1* que conferem resistência à ampicilina e tetraciclina, com base em MARON & AMES (1983).

6.4.2. Preparo dos Inóculos das Culturas de *Salmonella typhimurium*

Um volume de 120 μL da cultura descongelada estoque foi inoculada em 30 mL de caldo nutriente. Os frascos inoculados foram incubados a 35-37°C por 10-12 horas, sob agitação (150-170 rpm), de modo a obter-se uma densidade de 10^8 - 10^9 células mL^{-1} .

O controle da viabilidade de cada cepa foi feito através da contagem do número de unidades formadoras de colônias, de acordo com MARON & AMES (1983).

6.5. Procedimento Experimental

Um teste preliminar foi realizado com as cepas TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535 para verificar a citotoxicidade da substância teste para a bactéria. Este teste foi realizado utilizando-se as seguintes concentrações: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa^{-1} . Foram preparadas duas placas de cada concentração com e sem ativador metabólico. Os tratamentos controles, positivo, negativo e solvente (água), também foram realizados. Os resultados obtidos foram usados para determinar a concentração a ser usada no teste principal.

O método adotado no procedimento experimental foi o de incorporação em placas. Alíquotas de 24, 40 ou 80 μL das soluções estoque da substância teste, dependendo da concentração, foram adicionadas juntamente com 0,1 mL da suspensão de células (cultura "pernoite") e 0,5 mL de tampão fosfato ou 0,5 mL de mistura S-9 (dependendo do tratamento) em tubo de ensaio estéril contendo 2 mL de "top agar" com traços de histidina e biotina. Essa mistura foi homogeneizada em agitador de tubos por 2-3 segundos e vertida sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio de ágar mínimo seletivo a 2% de glicose para todas as cepas testadas, exceto para TA 97a que o ágar mínimo foi preparado com 0,4 % de glicose.

O mesmo procedimento foi adotado para os testes com ativador metabólico, realizado segundo MARON & AMES (1983), utilizando-se 0,5 mL placa^{-1} da mistura de S9 (5%) recém preparada.

Para todos os tratamentos, controles e substância teste, foram inoculadas placas em triplicata. Após 72 horas de incubação a 36-37°C, o número de colônias revertentes foi contado.

Os tratamentos controle usados foram:

	Controle	Cepa		
Sem S9	Negativo	0,1 mL	-	0,5 mL de tampão fosfato
	Solvente	0,1 mL	0,1 mL de solvente	0,5 mL de tampão fosfato
	Positivo	0,1 mL	0,05 mL de substância de referência *	0,5 mL de tampão fosfato
Com S9	Negativo	0,1 mL	-	0,5 mL de mistura S9
	Solvente	0,1 mL	0,1 mL de solvente	0,5 mL de mistura S9
	Positivo	0,1 mL	0,05 mL de substância de referência	0,5 mL de mistura S9

* Para a cepa TA 102 o volume é 0,1 mL.

6.5.1. Incorporação em Placa

Os componentes do teste (a cepa testada, a substância teste e a mistura S9 ou tampão fosfato) foram adicionadas ao top agar e agitadas. A mistura foi vertida na superfície de meio de cultura mínimo em placa e solidificada antes da incubação.

Alíquotas da solução da substância teste foram adicionadas proporcionalmente às soluções obtidas da solução estoque, e estavam relacionadas às seguintes concentrações em placas:

Concentrações da solução da substância teste (mg mL ⁻¹)		Aliquotas de	mg placa ⁻¹
Solução Estoque			
Teste Preliminar	Teste Definitivo		
125,11	125,14	40 µL	5,0
125,11	125,14	24 µL	3,0
12,511	12,514	80 µL	1,0
12,511	12,514	24 µL	0,3
1,2511	1,2514	80 µL	0,1
1,2511	1,2514	24 µL	0,03
0,12511	0,12514	80 µL	0,01
0,12511	0,12514	24 µL	0,003
-	0,012514	80 µL	0,001
-	0,012514	24 µL	0,0003

Em seguida, placas de nutriente ágar foram inoculadas para testar a esterilidade da solução da substância teste e da mistura S9. Diluições das culturas de bactérias foram plaqueadas em nutriente ágar para obter o número de unidades formadoras de colônia de cada cepa.

6.6. Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o Programa Salmonel Assay (MYERS *et. al.*, 1991).

Os dados estatísticos apresentam a contagem de placas individuais, a média de colônias revertentes por placa e o desvio padrão e a relação dose-resposta.

As contagens das placas dos controles positivo e negativo não foram utilizadas na análise estatística dos dados, pois é somente um controle das características genéticas das cepas. Somente o controle solvente é utilizado na análise estatística.

A substância teste é considerada mutagênica se os seguintes critérios forem alcançados:

- 1) Relação dose-resposta ($p < 0,05$) entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos;
- 2) E, em pelo menos uma dose, a razão de mutagenicidade [RM= número médio de revertentes espontâneos mais induzidos (substância teste) / número de revertentes espontâneos (controle com solvente)] for maior ou igual a 2 para TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 ou superior a 3 para a cepa TA 1535.

7. Resultados

7.1. Teste Preliminar

Um teste preliminar foi realizado com as cepas TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535 para verificar a toxicidade da substância teste para a bactéria. As seguintes concentrações foram testadas: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹. As médias das contagens obtidas estão apresentadas na Tabela 3. Considerando a citotoxicidade no teste preliminar as concentrações escolhidas para o teste principal foram de: 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 mg placa⁻¹ para a cepa TA 102 sem ativador metabólico, 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg placa⁻¹ para a cepa TA 97a com ativador metabólico, 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 97a sem ativador metabólico e TA 1535 com ativador metabólico, 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mg placa⁻¹ para a cepa TA 98 sem ativador metabólico e 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 5,0 mg placa⁻¹ para as cepas TA 100 e TA 1535 sem ativador metabólico e TA 98, TA 100 e TA 102 com ativador metabólico.

A citotoxicidade do produto GREENTEX OPF foi confirmada através do Teste principal, apresentado a seguir.

7.2. Teste Principal

Os resultados obtidos das características genéticas das cepas padrão confirmaram que as mesmas têm os genótipos necessários para o teste de mutagenicidade.

A concentração de 0,1 mg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade para a cepa TA 102 sem ativador metabólico; a concentração de 0,3 mg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade para a cepa TA 97a com ativador metabólico; a concentração de 1,0 mg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade para a cepa TA 97a sem ativador metabólico e TA 1535 com ativador metabólico; a concentração de 3,0 mg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade para a cepa TA 98 sem ativador metabólico, e a concentração de 5,0 mg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade para a cepa TA 100 sem ativador metabólico.

A viabilidade das cepas esteve também dentro do intervalo de variação de células por mL (10^8 - 10^9), de acordo com (MARON & AMES, 1983): TA 97a = $1,5 \times 10^9$; TA 98 = $4,9 \times 10^8$; TA 100 = $2,8 \times 10^9$; TA 102 = $4,8 \times 10^9$; TA 1535 = $1,8 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias mL⁻¹.

O lote de S-9 usado no teste foi checado com benzo(a)pireno e apresentou os resultados esperados (Tabela 4). O certificado do fabricante está apresentado no Anexo 01.

Os resultados obtidos no estudo e sua análise estatística estão reportados nos apêndices 1 a 10. Os controles positivos promoveram um aumento no número de revertentes em todas as cepas padrão, confirmando sua sensibilidade. As concentrações testadas da substância teste não promoveram um aumento em nenhuma das cepas testadas, quando comparada com os tratamentos controle, com e sem ativador metabólico. Isto confirma os resultados obtidos no teste preliminar.

As significâncias estatísticas observadas com TA 97, TA 98 e TA 102 sem e com ativador metabólico e TA 100 com ativador metabólico (Apêndice 01, 02, 04, 06, 07, 08 e 09 respectivamente) não foram consideradas porque a RM não foi maior que 2 em nenhum dos resultados obtidos. As significâncias estatísticas observadas com TA 1535 sem ativador metabólico (Apêndice 05) não foram consideradas porque a RM não foi maior que 3 em nenhum dos resultados obtidos.

8. Conclusão

Sob as condições do teste e resultados obtidos, a substância teste GREENTEX OPF não induziu atividade mutagênica nas cepas de *Salmonella Typhimurium* usadas no ensaio.

9. Referências Bibliográficas

AMES, B.N.; McCANN, J. & YAMASAKY E 1975. Methods for detecting carcinogenic and mutagens the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31: 347-364.

CLAXTON, D.; ALLEN, J.; AVLWITTO, A.; MORTELMANS, K. NESTMANN, E.; ZEIGER, E. 1987. Guide for *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation. Research*, 198: 83-91.

EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. 1995. Part 8030. *Salmonella* Microsomal Mutagenicity Test. In: EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th. Washington: American Public Health Association 1.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VENITT, S.; ZEIGER, E. 1994. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Research*, 312: 217-233.

LOVELL, D.P. 1997. Issues in the experimental design and statistical analysis of *in vitro* mutagenicity tests. *Drug Information Journal*, 31: 345-356.

MARON, D. & AMES, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

MARON, D.; KATZENELLENBOGEN, J.; AMES, B.N. 1981. Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test. *Mutation Research*, 88: 343- 350.

MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.

MYERS, L.E., ADAMS, N.; KIER, L.; RAO, T.K.; SHAW, B.; & WILLIAMS, L. 1991. Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/*Salmonella* test. In: D.Krewisk (Ed.). *Statistical Methods in Toxicological Research*. New York: Gordon and Breech, p. 265-279.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals. Genetic Toxicology: Bacterial Reverse Mutation Test, adopted in 1997. In: *OECD. Guidelines for the testing of chemicals*, 2001. Paris: No. 471.

Standard Methods for Waters and Wastewaters, 22a. Method 8030 - Mutagenesis – 2011.

SU L.H., CHIU C.H. *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature - *Chang Gung Med J* Vol.30 No. 3, 2007.

TINDALL B.J., GRIMONT P.A.D., GARRRITY G.M. and EUZÉBY J.P. Nomenclature and Taxonomy of the genus *Salmonella* - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2005), 55, 521-524.

Tabela 1 – Cepas que detectam agentes mutagênicos que causam mutação por deslocamento do quadro de leitura do ADN das bactérias e respectivos dados históricos das reversões espontâneas do laboratório.

Cepa	Sítio de mutação	Genótipo	Limite de controle superior e inferior (ufc) * Dados históricos do laboratório					
			Controle negativo		Água		Controle positivo	
			S9		S9		S9	
			+	-	+	-	+	-
TA 97a	CG	<i>His</i> D6610, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> -, <i>pKM101</i> (<i>Ap</i> ^R)	128-173 (57) [35]	119-155 (45) [26]	125-171 (57) [32]	114-163 (61) [36]	>346	>310
TA 98	CG	<i>His</i> D3052, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> -, <i>pKM101</i> (<i>Ap</i> ^R)	27-45 (23) [13]	24-42 (22) [12]	29-42 (17) [10]	23-45 (27) [16]	>90	>82

Legenda: *His* = mutação do gene responsável pela síntese de histidina; *rfa* = permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos; Δ *uvrB* = deleção do gene *uvrB*; *bio* - = mutação para biotina; *Ap*^R = ampicilina resistente, +: com S9; -: sem S9.
 *: Dados históricos do período de Julho a Setembro de 2013; () desvio médio do limite superior de controle, []: desvio padrão.

Tabela 2 – Cepas que detectam agentes mutagênicos que causam mutação por substituição de pares de bases do ADN das bactérias e respectivos dados históricos das reversões espontâneas do laboratório.

Cepa	Sítio de mutação	Genótipo	Limite de controle superior e inferior (ufc) * Dados históricos do laboratório					
			Controle negativo		Água		Controle positivo	
			S9		S9		S9	
			+	-	+	-	+	-
TA 1535	CG	<i>His</i> G46, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> -	15-29 (18) [10]	17-35 (23) [13]	16-29 (15) [9]	17-34 (21) [12]	>87	>105
TA 100	CG	<i>His</i> G46, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> -, <i>pKM101</i> (<i>Ap</i> ^R)	102-151 (62) [33]	105-145 (49) [27]	104-157 (67) [39]	105-145 (51) [29]	>302	>290
TA 102	AT	<i>His</i> G428, <i>rfa</i> , <i>pKM101</i> (<i>Ap</i> ^R), <i>pAQ1</i> (<i>Tt</i> ^R)	301-355 (67) [37]	282-340 (73) [44]	298-360 (78) [44]	276-340 (80) [44]	>710	>680

Legenda: *His* = mutação do gene responsável pela síntese de histidina; *rfa* = permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos; Δ *uvrB* = deleção do gene *uvrB*; *bio* - = mutação para biotina; *Ap*^R = ampicilina resistente; *Tt*^R = tetraciclina resistente, +: com S9; -: sem S9.
 *: Dados históricos do período de Julho a Setembro de 2013; () desvio médio do limite superior de controle, []: desvio padrão.

Tabela 3 – Resultados do teste preliminar com as cepas TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 e TA 1535 na presença e ausência de ativador metabólico.

	Controle	Dose (mg placa ⁻¹)	Contagem (ufc placa ⁻¹) **				
			TA 97a	TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535
Sem S9	Solvente	0,00	154	26	153	356	20
		0,003	172	30	162	371	23
		0,01	159	30	161	373	26
		0,03	166	31	161	364	23
		0,1	160	27	159	303	22
		0,3	155	28	164	305	21
		1,0	140	28	160	303	23
		3,0	136	18	156	287	23
		5,0	123	12	141	301	21
	Negativo	0,00	155	19	158	349	22
Positivo*	0,05	1994	2286	2871	1875	3228	
Com S9	Solvente	0,00	163	33	167	351	19
		0,003	177	56	179	371	24
		0,01	173	48	176	369	24
		0,03	167	48	176	369	24
		0,1	166	51	179	366	25
		0,3	118	46	177	358	22
		1,0	116	40	172	357	15
		3,0	115	44	172	355	11
		5,0	82	42	171	354	10
	Negativo	0,00	166	33	165	350	20
Positivo	0,05	3629	2838	6359	1203	802	

* Para a cepa TA 102 sem ativador metabólico o volume é 0,1 mL placa⁻¹.

** Os resultados apresentados são médias de duplicatas.

Tabela 4 – Resultados da verificação do lote 3090 de ativador metabólico com o benzo(a)pireno com a cepa TA 98.

Ativador metabólico	Tratamento	Volume (μ L/ placa)	Quantidade (μ g/placa)	Média de 2 repetições (colônias revertentes)
Presente	Benzo(a)pireno	10	10	198
		50	50	267
		100	100	241
		250	250	237
	2-aminoantraceno	50	NA	4442
	Controle solvente	100	NA	32
	Controle Negativo	-	-	35
Ausente	Benzo(a)pireno	10	10	26
		50	50	23
		100	100	24
		250	250	26
	2-aminoantraceno	50	NA	25
	Controle solvente	100	NA	29
	Controle negativo	-	-	22

NA: não aplicável.

Apêndice 01 – Análise Estatística com a Cepa TA 97a sem S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 1 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 97a Activation S9: -
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	mg/placa						
S	0.00	169	169	165	167.67	2.31	175.15
	0.003	192	197	187	192.00	5.00**	178.91
	0.01	182	186	184	184.00	2.00**	187.68
	0.03	174	184	163	173.67	10.50	
	0.10	183	173	184	180.00	6.08	
	0.30	189	186	164	179.67	13.65	
	1.00	157	142	141	146.67	8.96	
N	0.00	172	152	162			
P	0.05	1668	1538	1235			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 9-aminoacridine
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.139
 Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 1253.922755 .
 Standard error of the slope is = 655.169801 .
 90% confidence limits for the slope are <99.831519, 2408.013992>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.038

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Apêndice 02 – Análise Estatística com a Cepa TA 98 sem S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 2 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: -
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose mg/placa	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Bernstein
S	0.00	24	24	26	24.67	1.15	26.15
	0.01	32	32	32	32.00	0.00	28.70
	0.03	34	30	34	32.67	2.31*	33.80
	0.10	25	28	28	27.00	1.73	
	0.30	26	24	32	27.33	4.16	
	1.00	32	34	29	31.67	2.52*	
	3.00	15	14	19	16.00	2.65	
N	0.00	28	28	27			
P	0.05	3228	3922	2795			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-nitrofluorene
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.407
 Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 254.865757 .
 Standard error of the slope is = 72.973192 .
 90% confidence limits for the slope are <126.322407, 383.409107>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.002

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Apêndice 03 – Análise Estatística com a Cepa TA 100 sem S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 3 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: -
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Lintox1
	mg/placa						
S	0.00	129	120	135	128.00	7.55	136.43
	0.03	138	139	143	140.00	2.65	136.69
	0.10	132	151	143	142.00	9.54	137.26
	0.30	142	151	139	144.00	6.24	138.63
	1.00	135	131	143	136.33	6.11	140.85
	3.00	132	138	132	134.00	3.46	132.10
	5.00	109	119	108	112.00	6.08	112.59
N	0.00	120	117	119			
P	0.05	2015	1776	1755			

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis sodium azide
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Lintox1 with pval = 0.060

Estimate of the slope is = 37.646757 .
 Standard error of the slope is = 8.827868 .
 90% confidence limits for the slope are <22.096338, 53.197175>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.000
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

Apêndice 04 – Análise Estatística com a Cepa TA 102 sem S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 4 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 102 Activation S9: -
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted
						mg/placa	
S	0.00	279	272	274	275.00	3.61	
	0.0003	348	359	367	358.00	9.54**	
	0.001	365	362	350	359.00	7.94**	
	0.003	359	343	373	358.33	15.01**	
	0.01	354	353	368	358.33	8.39**	
	0.03	334	336	351	340.33	9.29**	
	0.10	262	266	250	259.33	8.33	
N	0.00	286	270	283			
P	0.10	1341	1278	1560			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis hydroperoxide cumene
 No acceptable model found

Analysis of variance

source	SS	DF	F-val	prob
Between doses	677.81	6	14.66	0.000
Within doses	19.90	14		

Apêndice 05 – Análise Estatística com a Cepa TA 1535 sem S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 5 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 1535 Activation S9: -
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	counts			Mean	S.D.	Predicted Bernstein
mg/placa	--	--	--	--			
S	0.00	25	23	27	25.00	2.00	28.66
	0.03	37	33	31	33.67	3.06*	29.59
	0.10	31	38	36	35.00	3.61*	31.75
	0.30	34	36	39	36.33	2.52*	37.94
	1.00	37	28	31	32.00	4.58	
	3.00	35	34	28	32.33	3.79	
N	0.00	27	26	24			
	0.05	3423	3402	3943	32.67	3.79	

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis sodium aizde
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.012
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.088
 Bernstein model used the first 4 doses

Estimate of the slope is = 30.928390 .
 Standard error of the slope is = 8.594942 .
 90% confidence limits for the slope are <15.788274, 46.068507>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.001
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

Apêndice 06 – Análise Estatística com a Cepa TA 97a com S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 6 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 97a Activation S9: + Rat Liver Aroclor 0.5 ml/plate
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted
mg/placa							
S	0.00	169	174	163	168.67	5.51	
	0.001	217	215	214	215.33	1.53**	
	0.003	210	204	213	209.00	4.58**	
	0.01	213	198	207	206.00	7.55**	
	0.03	196	203	204	201.00	4.36**	
	0.10	190	186	194	190.00	4.00*	
	0.30	150	142	137	143.00	6.56	
N	0.00	174	173	167			
P	0.05	1776	1798	1755			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoantracene
 No acceptable model found

Analysis of variance

source	SS	DF	F-val	prob
Between doses	565.11	6	13.17	0.000
Within doses	15.75	14		

Apêndice 07 – Análise Estatística com a Cepa TA 98 com S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 7 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: + Rat Liver AroIcor 0.5 ml/plate
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose mg/placa	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	33	35	36	34.67	1.53	37.57
	0.03	40	36	39	38.33	2.08	37.60
	0.10	36	35	43	38.00	4.36	37.68
	0.30	41	44	42	42.33	1.53*	37.90
	1.00	33	39	39	37.00	3.46	38.68
	3.00	34	43	47	41.33	6.66	40.91
	5.00	39	42	48	43.00	4.58	43.14
N	0.00	39	38	30			
P	0.05	1538	1841	1646			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water

N: Negative control not used in analysis

P: Positive control not used in analysis 2-aminoantracene

P-value for ANOVA test of dose response is 0.138

ANOVA test is not significant. Other significant results
should be viewed with caution.

An acceptable model is Linear with pval = 0.317

Estimate of the slope is = 1.113624 .

Standard error of the slope is = 0.482962 .

90% confidence limits for the slope are <0.262878, 1.964369>.

P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is 0.018

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Apêndice 08 – Análise Estatística com a Cepa TA 100 com S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 8 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: + Rat Liver AroIcor 0.5 ml/plate
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose	counts			Mean	S.D.	Predicted
	mg/placa	--	--	--			
S	0.00	135	126	138	133.00	6.24	
	0.03	173	184	182	179.67	5.86**	
	0.10	189	189	196	191.33	4.04**	
	0.30	178	199	183	186.67	10.97**	
	1.00	189	197	197	194.33	4.62**	
	3.00	183	179	178	180.00	2.65**	
	5.00	181	173	178	177.33	4.04**	
N	0.00	121	132	136			
P	0.05	1820	2101	1790			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoantracene
 No acceptable model found

Analysis of variance

source	SS	DF	F-val	prob
Between doses	437.17	6	9.50	0.000
Within doses	22.15	14		

Apêndice 09 – Análise Estatística com a Cepa TA 102 com S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 9 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 102 Activation S9: + Rat Liver AroIcor 0.5 ml/plate
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose mg/placa	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted
S	0.00	305	319	323	315.67	9.45	
	0.03	369	375	381	375.00	6.00**	
	0.10	359	365	367	363.67	4.16**	
	0.30	377	352	350	359.67	15.04*	
	1.00	359	363	357	359.67	3.06**	
	3.00	348	355	359	354.00	5.57*	
	5.00	317	333	341	330.33	12.22	
N	0.00	328	312	316			
P	0.05	1517	1538	1625			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoantracene
 No acceptable model found

Analysis of variance

source	SS	DF	F-val	prob
Between doses	125.14	6	9.12	0.000
Within doses	17.49	14		

Apêndice 10 – Análise Estatística com a Cepa TA 1535 com S9

Salmonella Assay

Test Sample Name: SAN-02337/13
 Source/Batch/Lot: 12973
 Solvent: water
 Record No.: 10 Exp. Date: 11/22/13 Exp. No.: 0004/3 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 1535 Activation S9: + Rat Liver AroIcor 0.5 ml/plate
 Data File Name: j:\model.sal

Code	Dose mg/placa	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	23	23	29	25.00	3.46	28.97
	0.003	30	29	34	31.00	2.65	28.94
	0.01	31	32	32	31.67	0.58	28.87
	0.03	26	26	31	27.67	2.89	28.68
	0.10	27	29	29	28.33	1.15	28.00
	0.30	24	27	33	28.00	4.58	26.08
	1.00	21	19	17	19.00	2.00	19.34
N	0.00	17	26	20			
P	0.05	1815	1148	1888			

S: Negative control for use in analysis water
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoantracene
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Linear with pval = 0.087

Estimate of the slope is = -9.628273 .
 Standard error of the slope is = 1.497253 .
 90% confidence limits for the slope are <-12.265706, -6.990839>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 1.000
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

Anexo 01 – Certificado do Ativador Metabólico
MOLTOX®

Molecular Toxicology, Inc.

**POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S9)
 QUALITY CONTROL & PRODUCTION CERTIFICATE**
Animal Information

SPECIES: Rat
 STRAIN: Sprague Dawley
 SEX: Male
 AGE: 5 – 6 weeks
 WEIGHT: 175 – 199 g
 TISSUE: Liver

Part Number Information

LOT NO.: 3090
 PART NO.: 11-01L
 VOLUME: 2.1 mL
 BUFFER: 0.15 M
 KCl/Lyophilization Buffer
 STORAGE: At or below -20°C

PREP: May 24, 2013
 EXPIRY: May 24, 2015
 INDUCING AGENT: Aroclor
 1254. (Monsanto KL615). 500
 mg/kg i.p.

REFERENCE: Maron, D & Ames, B., *Mutat Res*, 113: 173, 1983.

For Research Purposes Only

BIOCHEMISTRY:

- PROTEIN: 36.3 mg/ml

Assayed according to the method of Lowry et al., *JBC* 193:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

- ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

Activity	P450	Fold - Induction
BROD	2B1, 2B2	47.2
EROD	1A1, 1A2	96.6
MROD	1A1, 1A2	102.7
PROD	2B1, 2B2	30.8

Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, benzyl- and methoxyresorufin-0-dealkylases (PROD, BROD, & MROD) were conducted using a modification of the methods of Burke, et al., *Biochem Pharm* 34:3337, 1985. Fold-inductions were calculated as the ratio of the sample vs. uninduced specific activities (SA's). Control SA's (pmoles/min/ mg protein) were 72.7, 45.7, 15.2, & 21.4 for BROD, EROD, MROD and PROD, respectively.

BIOASSAY:
- TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS

Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 40 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

- PROMUTAGEN ACTIVATION

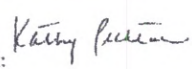
No. His⁺ Revertants
 TA98 TA1535
 315.6 1518

The ability of the sample to activate ethidium (EtBr) and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca, et al., *Mutation Res* 129: 299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per mg CPA.

Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 – 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(a)pyrene (BP) and 2-aminoanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted as described by Maron & Ames, (*Mutat Res* 113: 173, 1983).

µl S9 per plate/number his⁺ revertants per plate

Promutagen	0	1	5	10	20	50
BP (5 µg)	156	232	367	575	791	1244
2-AA (2.5 µg)	162	438	1836	2278	2351	2101

Approved:  05/28/13

MOLECULAR TOXICOLOGY, INC.

www.moltox.com

(828) 264-9099

Título do Estudo

Avaliação do potencial mutagênico da substância teste
GREENTEX OPF
através do ensaio de micronúcleo em camundongos



Metodologia de Referência

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1997.
Guidelines for Testing of Chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. N° 474.

Responsável Técnica

Kátia Fernanda Claudino Bastelli

Estudo Concluído

26/Mar/2014

Laboratório Executor

BIOAGRI Laboratórios Ltda.
Rod. SP 127, km 24
Telefone: +55 (19) 3429-7700 – Fax: +55 (19) 3429-7713
Caixa Postal 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba/SP - Brasil
www.bioagri.com.br
E-mail: bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador

GREEN TEX QUÍMICA LTDA.
Rua Geni Spiner, 45 – Bela Vista
Gaspar – SC
CEP: 89.110-000
Telefone/ Fax: (47) 3397-2183

Estudo #

BA LGO-0011/13

Declaração de Acompanhamento do Estudo

O estudo descrito neste Relatório foi executado sob minha supervisão, seguindo os procedimentos descritos no Guideline 474 (OECD, 1997).

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

Dados brutos originais, cópia do Relatório Final, as lâminas e todos os dados e observações referentes a este estudo, são arquivados na BIOAGRI Laboratórios Ltda.

Kátia F. Claudino Bastelli
Kátia Fernanda Claudino Bastelli
Responsável Técnica
Fone: (19) 3429-7700

26 maio 2019
dd mmm aaaa

Índice

	Página #
Declaração de Acompanhamento do Estudo	2
Índice	3
Resumo	5
1. Informações Gerais	5
2. Equipe Técnica	5
3. Definições	5
4. Objetivo	6
5. Material e Métodos	6
5.1. Informações Referentes à Substância Teste	6
5.2. Informações Referentes à Substância de Referência	6
5.3. Equipamentos	7
5.4. Material, Reagentes e/ou Solventes	7
5.5. Preparo da Substância Teste	7
5.5.1. Solubilização da Substância Teste	7
5.5.1.1. Justificativa para a Escolha do veículo	7
5.5.2. Preparo das Soluções Teste	7
5.5.2.1. Teste Preliminar	7
5.5.2.2. Teste Definitivo	8
5.6. Sistema-Teste	8
5.6.1. Justificativa da Seleção do Sistema Teste	8
5.6.2. Alojamento	8
5.6.3. Condições Ambientais	8
5.6.4. Alimentação	8
5.6.5. Dados Históricos dos Controles Positivo e Negativo	9
5.6.6. Declaração de Conformidade Com o Bem Estar Animal	9
5.7. Procedimento Experimental	9
5.7.1. Dosagens Utilizadas da Substância Teste	10
5.7.2. Preparo da Medula Óssea	10
5.7.3. Análise Microscópica	11
5.8. Análise Estatística	11
6. Resultados e Discussão	11
6.1. Teste Preliminar	11
6.2. Definição das Doses do Teste Definitivo	11
6.3. Teste Definitivo	12
7. Conclusão	13
8. Referências Bibliográficas	13

Tabelas

	Página #
Tabela 1 – Dados Históricos dos Controles Positivo e Negativo (Número Médio de Micronúcleos Encontrados em Eritrócitos Policromáticos (MNPCE) e a proporção de PCE/(PCE + NCE).....	14
Tabela 2 – Grupos de Animais e Tratamentos.....	14
Tabela 3 – Mortalidade dos Animais no Teste Preliminar.....	14
Tabela 4 – Avaliação dos Sinais Clínicos no Teste Preliminar.....	15
Tabela 5 – Resultado da Citotoxicidade no Teste Preliminar.....	16
Tabela 6 – Avaliação dos Sinais Clínicos no Teste Definitivo.....	17
Tabela 7 – Dados Individuais Obtidos no Teste Definitivo.....	18
Tabela 8 – Análise Estatística da Substância Teste e dos Controles Positivo e Negativo no Número de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos (MNPCE's) e a Proporção de PCE / (PCE + NCE) das Células da Medula Óssea de Camundongos (Valores Médios Obtidos de 5 Animais de Cada Sexo/Dose).....	19
Tabela 9 – Análise Estatística da Substância Teste e Controles Positivo e Negativo o Número de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos (MNPCEs) e a Proporção de PCE / (PCE + NCE) das Células da Medula Óssea de Camundongo (Valores Médios Obtidos de 10 Animais, Machos e Fêmeas/Dose).....	19

Resumo

O teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos foi conduzido para avaliar o potencial mutagênico da substância teste GREENTEX OPF. A substância teste foi diluída em água purificada estéril e administrada pela via intraperitoneal em duas aplicações, num intervalo de 24 horas, nas doses de 137,5; 275 e 550 mg kg⁻¹ (p.c.). Na administração dos controles positivo e negativo empregou-se o mesmo procedimento da substância teste. O grupo controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância teste e o controle positivo com a ciclofosfamida (25 mg kg⁻¹, p.c.). Após 24 horas da segunda aplicação, os animais foram eutanasiados e seus fêmures removidos para obtenção das células da medula óssea. Esfregaços destas células foram preparados e corados em lâminas, as quais foram utilizadas para as observações microscópicas. De acordo com os resultados, não houve aumento no número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nos animais tratados com a substância teste em comparação com o controle negativo. Um aumento estatisticamente significativo foi observado nessa variável em animais tratados com a ciclofosfamida, conforme esperado. Nas condições desse estudo os resultados indicaram que a substância teste GREENTEX OPF não apresentou evidência de atividade mutagênica em camundongos.

1. Informações Gerais

Data do Início do Experimento:	08/Jan/2014
Data do Término do Experimento:	26/Mar/2014
Data do Relatório:	26/Mar/2014

2. Equipe Técnica

Responsável técnica:	Kátia Fernanda Claudino Bastelli
Auxiliar de laboratório:	Bruna C. Teixeira Gomes
Técnicas de laboratório:	Patrícia Jacqueline da Silva Carpinelli Fernanda Regina Tulho de Lima
Pessoal:	Cintia Kaori Miyaji

3. Definições

Micronúcleos (MN): são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose (meiose) por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

Eritrócito normocromático (NCE): é um eritrócito maduro, sem ribossomos e pode ser distinguido dos eritrócitos imaturos (policromáticos) pela coloração seletiva para ribossomos.

Eritrócito policromático (PCE): é um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático por coloração seletiva para ribossomos.

4. Objetivo

O estudo tem por objetivo avaliar o potencial mutagênico da substância teste GREENTEX OPF em camundongos. Os resultados obtidos fornecem informações sobre o potencial clastogênico da substância teste em induzir um aumento no número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCE's) e normocromáticos (NCE's) da medula óssea de camundongos.

5. Material e Métodos

5.1. Informações Referentes à Substância Teste

Substância-teste:	GREENTEX OPF
Recebida em:	18/Jul/2013
Código BIOAGRI:	SAN-2337/13
Número do lote:	12973
Data de fabricação:	10/Fev/2013
Data de validade:	10/Out/2015
Ingrediente ativo:	fosfato
Hexametáfosfato de sódio	75%
Fosfato monossódico anidro	25%
Substância teste enviada por:	GREEN TEX QUÍMICA LTDA.

5.2. Informações Referentes à Substância de Referência

Substância de referência:	Ciclofosfamida monohidratada
Lote:	SBLC0666V
Número do CAS:	6055-19-2 ⁽¹⁾
Fórmula molecular:	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$ ⁽¹⁾
Nome químico (IUPAC):	2H-1,3,2-Oxazaphosphorin-2-amine, N,N-bis(2-chloroethyl)tetrahydro-2-oxide ⁽¹⁾
Data de validade:	Mar/2015
Concentração:	102,3%
Fabricante:	Sigma Aldrich
Fonte:	⁽¹⁾ Informações fornecidas pelo fabricante.

5.3. Equipamentos

Autoclave
Agitador magnético
Balança analítica
Balança semi-analítica
Banho maria
Câmara de indução anestésica e eutanásia
Centrífuga
Estufa de secagem
Freezer
Geladeira
Micropipeta
Microscópio
Termo-higrômetro
Termômetro
Ultra-som

5.4. Material, Reagentes e/ou Solventes

Água purificada estéril
Óleo de milho
Álcool 70%
Ciclofosfamida monohidratada – 102,3%
Soro fetal bovino
Corante giemsa
Solução tampão fosfato
Solução salina esterilizada – 0,9%
Corante wright
Entellan

5.5. Preparo da Substância Teste

5.5.1. Solubilização da Substância Teste

Foi conduzido um teste de solubilização para a substância teste, onde foi testado o óleo de milho e a água purificada, como veículos. Uma alíquota de 0,25 g de substância teste foi diluída em um volume final de 15 mL para os dois veículos.

5.5.1.1. Justificativa para a Escolha do veículo

A partir do teste de solubilização, a água purificada foi escolhida como veículo para a solubilização da substância teste, pois foi observada boa afinidade do veículo com a substância teste, não produz efeitos tóxicos e é recomendado pelo Guideline OECD-474 (1997).

5.5.2. Preparo das Soluções Teste

5.5.2.1. Teste Preliminar

No momento de cada aplicação, a substância teste foi pesada para o teste preliminar e dissolvida em 05 concentrações: 16,6667; 25,0; 36,6667; 55,0 e 66,6667 mg mL⁻¹ para os grupos de animais machos e fêmeas. A substância teste foi solubilizada em veículo apropriado esterilizado (óleo de milho), em um volume final de 15 mL para cada concentração.

O grupo controle negativo do teste preliminar recebeu o veículo esterilizado.

5.5.2.2. Teste Definitivo

No momento de cada aplicação, a substância teste foi pesada para o teste definitivo e dissolvida em 03 concentrações: 9,1667 (2A); 18,3333 (3A) e 36,6667 (4A) mg mL⁻¹. A substância teste foi solubilizada em veículo apropriado esterilizado (água purificada), em um volume final de 15 mL.

O grupo controle negativo (1A) recebeu o veículo esterilizado. A ciclofosfamida empregada no grupo controle positivo (3A) foi dissolvida em solução salina esterilizada (0,9 %) e administrada na concentração de 1,6667 mg mL⁻¹ correspondendo à dose de 25 mg kg⁻¹ do peso corpóreo do animal.

5.6. Sistema-Teste

Foram empregados camundongos (*Mus-musculus*), "swiss" albinos, jovens, adultos e saudáveis, com idade de 8 a 11 semanas e pesando entre 24 e 33 g, adquiridos de unidades de criação selecionadas (Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda.), inspecionados e aclimatados às condições do laboratório por 5 dias. Animais de ambos os sexos, 5 machos e 5 fêmeas, foram usados para cada tratamento. A seleção dos animais para compor os grupos em cada tratamento foi feita por randomização, obedecendo-se uma variação do peso médio de $\pm 20\%$ calculada separadamente para machos e fêmeas.

5.6.1. Justificativa da Seleção do Sistema Teste

O camundongo é um modelo universal na avaliação do potencial mutagênico de várias classes de grupos químicos, com um grande histórico de dados. É a espécie recomendada por várias agências regulatórias e tem se demonstrado sensível para detecção de agentes causadores de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, de acordo com OECD 474 (1997).

5.6.2. Alojamento

Os animais foram mantidos em grupos de 5 animais para cada sexo em gaiola de polipropileno fechada com grade metálica e suspensa. As gaiolas foram forradas com serragem previamente esterilizada. Todas as condições do alojamento e cuidados de higiene e sanitização basearam-se nos padrões recomendados. Cada gaiola foi devidamente identificada com o número do estudo, código da amostra, sexo e dose administrada.

5.6.3. Condições Ambientais

Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas e monitoradas durante 24 horas para: temperatura (mín de 21,7°C e máx de 24,6°C), umidade (mín de 58% e máx de 70%), ciclos de luz (12 horas claro / 12 horas escuro) e ventilação (de 10 a 15 trocas de ar hora). Dados de temperatura e umidade foram anotados em livro de registros.

5.6.4. Alimentação

Os animais foram mantidos em dieta equilibrada à base de ração comercial peletizada (Nome Comercial: Presence; Marca Evalis.; Lote: 41EX130035077; Validade: 29/Abr/2014 e Lote: 41EX140036936; Validade: 05/Ago/2014) e água *ad libitum*. Os resultados obtidos para as análises da composição química, microbiológica e de micotoxinas estiveram dentro do padrão de qualidade esperado para ração. A água fornecida atende aos padrões de qualidade para consumo humano.

5.6.5. Dados Históricos dos Controles Positivo e Negativo.

Os resultados dos grupos controle positivo e negativo deste estudo foram comparados com os valores médios da proporção de eritrócitos e micronúcleos obtidos nos estudos realizados no período de Janeiro à Dezembro de 2013, para confirmar que os animais utilizados no teste definitivo apresentaram sensibilidade aos agentes mutagênicos.

5.6.6. Declaração de Conformidade Com o Bem Estar Animal

Este estudo foi conduzido em conformidade com todas as leis aplicáveis ao bem estar animal de uso e cuidado de animais de laboratório. Sempre que possível, os procedimentos são delineados visando evitar ou minimizar o desconforto, angústia ou dor aos animais. Os procedimentos de cuidados com os animais foram realizadas de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (National Research Council – Edição em português, 2003, 162 p.).

5.7. Procedimento Experimental

Via de Administração: A substância teste foi administrada por injeção intraperitoneal. O volume líquido máximo administrado não excedeu 2 mL / 100 g de peso corpóreo.

Justificativa da via de exposição: a cavidade intraperitoneal é uma via que proporciona ampla absorção de materiais injetáveis, permitindo a instilação de grandes volumes (ROLLIN & KESEL, 1995), além disso, é recomendada pelo protocolo OECD-474 (1997).

Observações clínicas: Para avaliar os efeitos tóxicos da substância teste nos animais foram considerados os sintomas clínicos, mortalidade e a citotoxicidade (nos animais sobreviventes). Mortalidade e sinais clínicos foram avaliados com atenção especial durante as quatro primeiras horas e 24 horas após primeira e segunda aplicação. As observações clínicas foram realizadas durante o período de exposição da substância teste nos testes preliminar e definitivo. Estes sinais clínicos incluíram, mas não se limitaram a: alterações de pele, pêlos, olhos e membranas mucosas; alterações nos sistemas respiratório, circulatório e nervoso; atividade somatomotora e padrão comportamental, com particular atenção para aparecimento de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, coma e morte. Todas as observações foram registradas.

O teste preliminar foi conduzido com seis animais (três machos e três fêmeas) por dose.

O teste definitivo foi conduzido com dez animais (cinco machos e cinco fêmeas) por dose. Sinais clínicos e contagem de micronúcleos foram avaliados nesta etapa do estudo.

Os animais foram tratados duas vezes com injeções intraperitoneais em um intervalo de 24 horas sendo, que em cada concentração, receberam um volume correspondente a 0,45 mL para cada 30 g de peso corpóreo. Estes animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após a segunda aplicação. O mesmo procedimento foi empregado para os controles negativo e positivo.

5.7.1. Dosagens Utilizadas da Substância Teste

A dosagem utilizada da substância teste no teste definitivo foi: 137,5 (2A); 275 (3A) e 550 (4A) mg kg⁻¹ em um volume final de 15 mL. Os grupos, tratamentos e tempos de amostragem estão exemplificados na Tabela 2.

5.7.2. Preparo da Medula Óssea

O protocolo seguido é uma adaptação do procedimento descrito por SCHMID (1975). Os animais dos grupos tratados e controle (positivo e negativo) foram eutanasiados 24 horas após a segunda aplicação, em câmara de CO₂ e O₂, a morte dos animais foi confirmada através do 2º método de eutanásia (deslocamento cervical). Em seguida os fêmures foram totalmente removidos e limpos externamente; as porções epifiseal distal e proximal foram removidas com o auxílio de uma tesoura até o aparecimento da medula. As células da medula óssea foram extraídas por lavagens sucessivas com 2 mL de soro fetal bovino, administrado com seringa e agulha estéreis. A solução contendo as células da medula óssea foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, as células foram ressuspensas, preparadas em lâminas de microscopia através de esfregaço (2 lâminas para cada animal) e as lâminas foram secas à temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram fixadas em álcool 70% por 10 minutos. No teste preliminar as lâminas foram coradas pelo método de Leishmann em água purificada (na proporção de 1:6, respectivamente) por 15 minutos. e no teste definitivo as lâminas foram coradas com solução concentrada de Wright por 3 minutos; em seguida, foram colocadas em solução de Wright tampão fosfato (pH 6,0; 1:1) por um minuto, enxaguadas e imersas em solução de Giemsa – tampão - água purificada por 10 minutos.

As lâminas coradas foram lavadas em água corrente, secas e montadas em Permount.

5.7.3. Análise Microscópica

As lâminas foram codificadas e observadas em objetiva de aumento 1000X em microscópio ótico Olympus. A codificação das lâminas foi feita de forma randomizada, para que os técnicos de leitura fossem incapazes de identificar os tratamentos correspondentes às respectivas lâminas.

Teste preliminar:

Análises da citotoxicidade na medula óssea dos animais sobreviventes foram realizadas através da contagem de pelo menos 200 eritrócitos policromáticos e do cálculo da proporção de eritrócitos imaturos (PCE) sobre o total de eritrócitos (PCE + NCE). Os resultados da média das leituras e da relação dos eritrócitos estão representados na Tabela 5.

Teste definitivo:

Pelo menos 2.000 eritrócitos policromáticos (PCE's) foram contados, por animal, para a incidência dos eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE's). Ao mesmo tempo, eritrócitos normocromáticos (NCE's) e micronúcleos (MN) foram examinados e registrados. A proporção de eritrócitos imaturos (PCE) sobre o total de eritrócitos (PCE + NCE) foi determinada para cada animal. Foram consideradas, para a contagem, apenas células íntegras apresentando forma arredondada com citoplasma intacto e estruturas intracitoplasmáticas identificáveis como micronúcleos, ou seja, as que apresentaram forma arredondada, estando no mesmo plano do citoplasma, sem refringência e que possuíam tamanho de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo dos eritrócitos.

5.8. Análise Estatística

As diferenças na incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE's) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MNNCE's) por 2.000 células e a proporção de eritrócitos policromáticos sobre o total de eritrócitos ($PCE/(PCE + NCE)$) foram comparadas empregando-se o teste U Mann-Whitney e o teste K para variáveis independentes segundo Kruskal & Wallis Test citado por Conover (1980). As amostras foram comparadas ao controle negativo e os resultados avaliados estatisticamente com dois níveis de significância ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$).

Para considerar que uma substância produz um efeito positivo é necessário que ocorra um aumento estatisticamente significativo no número de eritrócitos policromáticos micronucleados relacionado à dose, quando comparado ao controle negativo.

6. Resultados e Discussão

6.1. Teste Preliminar

Um teste preliminar foi conduzido nas doses de 250, 375, 550, 825 e 1000 mg kg⁻¹, efeitos tóxicos (mortalidade e sinais clínicos) estão representados nas Tabelas 3 e 5, respectivamente. Os resultados da média das leituras e a proporção dos eritrócitos (citotoxicidade) estão representados na Tabela 4.

6.2. Definição das Doses do Teste Definitivo

As doses estabelecidas para o teste definitivo foram: 137,5; 275 e 550 mg kg⁻¹. A Dose Máxima Tolerada (DMT) foi 550 mg kg⁻¹, uma vez que esta dose, no estudo preliminar, demonstrou efeitos tóxicos (sinais clínicos, como: eriçamento de pelos e taquipnéia e não apresentou mortalidade, estando de acordo com o recomendado no protocolo OECD 474 (1997).

6.3. Teste Definitivo

Os animais foram observados individualmente após cada aplicação da substância teste, nos primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas (com especial atenção nas primeiras 4 horas). Todas as alterações observadas neste período foram sistematicamente registradas, sendo mantidos registros individuais para cada animal.

Os dados individuais dos animais obtidos no teste definitivo, tais como: peso dos animais, peso médio e desvio padrão, número de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos e normocromáticos, e a proporção de eritrócitos policromáticos sobre o total de eritrócitos ($PCE/(PCE+NCE)$) estão representados na Tabela 7.

Os dados estatísticos foram analisados juntos e também separados por sexo, os resultados estão representados nas Tabelas 8 e 9.

Na Tabela 8 foi observada significância estatística $\leq 0,05$ no controle positivo para o grupo de fêmeas na proporção de eritrócitos policromáticos sobre o total de eritrócitos ($PCE/(PCE+NCE)$), no entanto, esta significância estatística observada não deve ser considerada, pois o protocolo OECD-474 (1997) define que a diferença na proporção de eritrócitos $PCE/(PCE+NCE)$ não deve ser menor que 20% do valor do controle negativo, portanto as doses utilizadas atendem aos critérios do protocolo.

A análise estatística dos resultados indica que a substância-teste não induziu um aumento no número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de camundongos, quando comparado com o controle negativo, em nenhuma das concentrações avaliadas.

Nenhum efeito adverso foi observado na proporção de eritrócitos policromáticos sobre o total de eritrócitos (PCE/(PCE+NCE)) nos animais tratados com a substância teste GREENTEX OPF, nas concentrações avaliadas.

Um aumento estatisticamente significativo de células micronucleadas de eritrócitos policromáticos e normocromáticos foi observado em animais tratados com a ciclofosfamida, conforme esperado.

7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, a substância teste GREENTEX OPF não apresentou efeitos positivos relacionados às doses ou grupos isolados ao nível de 5% ($p \leq 0,05$). Portanto, pode-se concluir que a mesma não apresentou potencial de atividade mutagênica para camundongos, nas condições do teste.

8. Referências Bibliográficas

- Conover, W.J. 1980. *Practical Nonparametric Statistics*. New York: Willey & Sons, 2nd ed.
- GAD, S.C.; CHENGELIS, C.P. *Acute Toxicology Testing*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1998. Chapter 11, p. 305-355: Considerations specific to animal test models.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório*. Tradução de Guillermo Alexander Botovchenco Rivera. Goiânia: National Academy Press, 2003. 162p.
- Mavournin, K.H.; Blakey, D.H.; Cimino, M.C.; Heddle, J.A. 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res*, Vol. 239, p. 29-80.
- Müller, W.U.; Streffer, C. 1994. *Micronucleus Assays*. Edited by G. Obe. 5th ed. *Advances in mutagenesis research*. New York: Springer-Verlag, p. 1-134.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 1997. *Guidelines for Testing of Chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. N^o 474.
- ROLLIN, B. E.; KESEL, M. L. *The Experimental Animal in Biomedical Research*. Volume 2. London: CRC Press, 1995. Chapter 12, p.281-307.
- Salamone, M.F. & Heddle, J.A. 1983. *The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol*. In: de Serres, F.J.; Hollaender, A.(eds.). *Chemicals mutagens; principles and methods for their detection*. New York: Plenum Press, Vol. 8, p. 111-143.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 31, p. 9-15.
- Thompson, W.R; Weil, C.S. 1952. *Biometrics*, Vol. 8, p. 51-54.

Tabela 1 – Dados Históricos dos Controles Positivo e Negativo (Número Médio de Micronúcleos Encontrados em Eritrócitos Policromáticos (MNPCE) e a proporção de PCE/(PCE + NCE).

Parâmetros Avaliados	Machos				Fêmeas			
	Controle Positivo		Controle Negativo		Controle Positivo		Controle Negativo	
	PCE's/ NCE's+PCE's (1)	MNPCE's (2)	PCE's/ NCE's+PCE's (1)	MNPCE's (2)	PCE/ NCE's+PCE's (1)	MNPCE's (2)	PCE's/ NCE's+PCE's (1)	MNPCE's (2)
Média	0,52	7,72	0,54	0,49	0,52	7,86	0,54	0,47
Amplitude média	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-

Controle Positivo: Ciclofosfamida - Lotes: 079K1569 e 120M1253V; Dados do período de Janeiro à Dezembro de 2013.

PCE: Eritrócito policromático; NCE: eritrócito normocromático; MNPCE: eritrócito policromático micronucleado.

(1) Média da relação PCEs/(PCEs+NCEs) OECD, 474 (1997);

(2) Média de micronúcleos de 5 animais.

A taxa de eritrócitos policromáticos com micronúcleos espontâneos é muito baixa, por volta de 3 por 1000 células. (Müller & Streffer, 1994).

Tabela 2 – Grupos de Animais e Tratamentos.

Grupos	Animais		Tratamentos	Tempo de amostragem (h) após a segunda aplicação
	Machos	Fêmeas		
1 A	5	5	Controle negativo (água purificada)	24
2 A	5	5	Substância teste (dose baixa)	24
3 A	5	5	Substância teste (dose média)	24
4 A	5	5	Substância teste (DMT)	24
5 A	5	5	Controle positivo (ciclofosfamida)	24

DMT: Dose Máxima Tolerada

Tabela 3 – Mortalidade dos Animais no Teste Preliminar.

Dose (mg kg ⁻¹ de peso corpóreo)	Sexo	Mortalidade/Nº de Animais
Controle Negativo	Macho	0/3
	Fêmea	0/3
250	Macho	0/3
	Fêmea	0/3
372	Macho	0/3
	Fêmea	0/3
550	Macho	0/3
	Fêmea	0/3
825	Macho	3/3
	Fêmea	3/3
1000	Macho	3/3
	Fêmea	3/3

Tabela 4 – Avaliação dos Sinais Clínicos no Teste Preliminar.

Dose (mg kg ⁻¹)	Animais #	Sexo	Primeira aplicação			Segunda aplicação		
			Até 30'	30' a 4 horas	Até 24 horas	Até 30'	30' a 4 horas	Até 24 horas
Controle negativo	1	♂	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
	1	♀	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
250	1	♂	1;4	1;4	1	1;4	1	1
	2		1;4	1;4	1	1;4	1	1
	3		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	1	♀	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	2		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1
	3		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1
375	1	♂	1;4	1;4	1	1;4	1	1
	2		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	3		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1;4
	1	♀	1;4	1;4	1;4	1;4	1	1
	2		1;4	1;4	1	1;4	1	1
	3		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1;4
550	1	♂	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	2		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1
	3		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	1	♀	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	2		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	3		1;4	1;4	1	1;4	1;4	1
825	1	♂	1;4;6	1;4;6	1;4	1;4;6	1;4;6	14
	2		1;4;6	1;4;6	1;4	1;4;6	1;4;6	14
	3		1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	1	♀	1;4;6	1;4;6	1;4;6	1;4;6	1;4;6	14
	2		1;4;6	1;4;6	1;4	1;4;6	1;4;6	14
	3		1;4;6	1;4;6	14	1;4;6	1;4;6	14
1000	1	♂	1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	2		1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	3		1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	1	♀	1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	2		1;4;6	1;4;6	14	-	-	-
	3		1;4;6	1;4;6	14	-	-	-

Legenda:

- | | |
|---|----------------|
| 0. Sem alterações observáveis; | 8. Convulsões; |
| 1. Alterações de pele e pelos (pelos eriçados); | 9. Salivação; |
| 2. Alterações de olhos; | 10. Diarreia; |
| 3. Alterações de mucosas; | 11. Letargia; |
| 4. Alterações no sistema respiratório (taquipnéia); | 12. Tremores; |
| 5. Alterações no sistema circulatório; | 13. Coma; |
| 6. Alteração no sistema nervoso (incoordenação motora); | 14. Morte; |
| 7. Alterações no padrão comportamental (agitação); | 15. Outros. |

Tabela 5 – Resultado da Citotoxicidade no Teste Preliminar.

Dose (mg kg ⁻¹)	Sexo	PCEs	NCEs	PCE/ (PCE + NCE)	Citotoxicidade (%)*
250	Macho	207,33	132,67	0,61	-5,17
	Fêmea	213,00	141,67	0,60	0,00
375	Macho	210,67	150,33	0,58	0,00
	Fêmea	208,33	141,00	0,60	0,00
550	Macho	210,00	134,33	0,61	-5,17
	Fêmea	207,33	144,67	0,59	1,67
Controle negativo	Macho	210,00	149,33	0,58	-
	Fêmea	205,87	138,33	0,60	-

Legenda: PCE = Eritrócitos policromáticos; NCE = Eritrócitos normocromáticos.

*Citotoxicidade (%) = (Total Controle Negativo – Dose Total / Total Controle Negativo) x 100

Tabela 6 – Avaliação dos Sinais Clínicos no Teste Definitivo.

Dose (mg kg ⁻¹)	Nº Animais	Sexo	Primeira aplicação			Segunda aplicação		
			Até 30'	30' a 4 horas	Até 24 horas	Até 30'	30' a 4 horas	Até 24 horas
Controle negativo	1	♂	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0
	5		0	0	0	0	0	0
	1	♀	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0
	5		0	0	0	0	0	0
137,5	1	♂	1	0	0	1	0	0
	2		1	0	0	1	0	0
	3		1	0	0	1	0	0
	4		1	0	0	1	0	0
	5		1	0	0	1	0	0
	1	♀	1	0	0	1	0	0
	2		1	0	0	1	0	0
	3		1	0	0	1	0	0
	4		1	0	0	1	0	0
	5		1	0	0	1	0	0
275	1	♂	1	1	0	1	1	0
	2		1	1	0	1	1	0
	3		1	1	0	1	1	0
	4		1	1	0	1	1	0
	5		1	1	0	1	1	0
	1	♀	1	1	0	1	1	0
	2		1	1	0	1	1	0
	3		1	1	0	1	1	0
	4		1	1	0	1	1	0
	5		1	1	0	1	1	0
550	1	♂	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	2		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	3		1;4	1	1;4	1;4	1;4	1;4
	4		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	5		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1
	1	♀	1;4	1	1;4	1;4	1;4	1;4
	2		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	3		1;4	1;4	1;4	1;4	1;4	1;4
	4		1;4	1	1;4	1;4	1;4	1;4
	5		1;4	1	1;4	1;4	1;4	1;4
Controle positivo	1	♂	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0
	5		0	0	0	0	0	0
	1	♀	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0
	5		0	0	0	0	0	0

Legenda:

- | | | |
|---|---|---------------|
| 0. Sem alterações observáveis; | 6. Alteração no sistema nervoso (incoordenação motora); | 11. Letargia; |
| 1. Alterações de pele e pelos (pelos eriçados); | 7. Alterações no padrão comportamental (agitação); | 12. Tremores; |
| 2. Alterações de olhos; | 8. Convulsões; | 13. Coma; |
| 3. Alterações de mucosas; | 9. Salivação; | 14. Morte; |
| 4. Alterações no sistema respiratório (taquipnéia); | 10. Diarreia; | 15. Outros. |
| 5. Alterações no sistema circulatório; | | |

Tabela 7 – Dados Individuais Obtidos no Teste Definitivo.

Obs	Sexo	Dose (mg kg ⁻¹)	Peso Inicial (g)	Média de peso (g) Desvio padrão(%)	Peso Final (g)	MNPCE	MNNCE	PCE	NCE	Média de MNPCE	Desvio Padrão de MNPCE	PCE/ (PCE + NCE)	
1	Grupo Macho	Controle Negativo	27	Média: 26,0	26	0	0	2002	1729	0,20	0,45	0,53659	
2			25		25	0	0	2006	1763			0,53224	
3			26	Desvio Padrão: 6,08	26	0	0	2018	1679			0,54585	
4			24		24	1	0	2028	1707			0,54297	
5			28		27	0	0	2005	1756			0,53310	
6		137,5	Controle Negativo	26	Média: 25,0	26	3	0	2008	1805	1,00	1,22	0,52662
7				25		25	1	0	2013	1652			0,54925
8				24	Desvio Padrão: 4,00	24	1	0	2008	1698			0,54182
9				24		24	0	0	2009	1770			0,53162
10				26		26	0	0	2003	1818			0,52421
11		275	Controle Negativo	24	Média: 25,8	24	0	0	2016	1625	0,20	0,45	0,55369
12				28		28	0	0	2013	1722			0,53896
13				26	Desvio Padrão: 5,75	26	1	0	2010	1722			0,53859
14				25		24	0	0	2035	1668			0,54955
15				26		26	0	0	2001	1765			0,53133
16		550	Controle Negativo	25	Média: 25,6	25	1	0	2009	1612	0,40	0,55	0,55482
17				24		24	0	0	2008	1689			0,54314
18				28	Desvio Padrão: 7,10	27	1	0	2008	1786			0,52926
19				27		27	0	0	2011	1712			0,54016
20				24		24	0	0	2026	1934			0,51162
21		Controle Positivo	Controle Positivo	24	Média: 25,8	24	8	0	2015	1648	8,40	1,14	0,55010
22				25		24	8	0	2062	1721			0,54507
23				24	Desvio Padrão: 9,65	24	7	0	2038	1779			0,53393
24				30		30	9	0	2014	1803			0,52764
25				26		26	10	2	2000	1925			0,50955
26	Controle Negativo	Controle Negativo	24	Média: 26,2	24	0	0	2003	1605	0,40	0,55	0,55516	
27			26		25	1	0	2009	1923			0,51094	
28			25	Desvio Padrão: 7,34	25	0	0	2014	1772			0,53196	
29			29		29	0	0	2028	1875			0,51960	
30			27		29	1	0	2014	1732			0,53764	
31	137,5	Controle Negativo	24	Média: 24,4	25	0	0	2011	1639	0,00	0,00	0,55096	
32			24		24	0	0	2004	1761			0,53227	
33			24	Desvio Padrão: 2,24	24	0	0	2009	1667			0,54652	
34			25		25	0	0	2015	1689			0,54401	
35			25		25	0	0	2053	1809			0,53159	
36	275	Controle Negativo	24	Média: 25,2	24	0	0	2056	1854	0,00	0,00-	0,52583	
37			25		26	0	0	2019	1718			0,54027	
38			27	Desvio Padrão: 5,17	27	0	0	2006	1966			0,50504	
39			26		26	0	0	2053	1700			0,54703	
40			24		24	0	0	2011	1696			0,54249	
41	550	Controle Negativo	24	Média: 26,4	24	2	0	2017	1683	0,40	0,89	0,54514	
42			26		25	0	0	2005	1774			0,53056	
43			28	Desvio Padrão: 5,74	28	0	0	2013	1786			0,52988	
44			27		26	0	0	2022	1793			0,53001	
45			27		27	0	0	2041	1791			0,53262	
46	Controle Positivo	Controle Positivo	24	Média: 25,6	25	9	0	2015	1834	8,40	1,34	0,52351	
47			24		24	10	1	2026	1814			0,52760	
48			24	Desvio Padrão: 8,99	24	9	0	2065	1924			0,51767	
49			29		29	7	1	2023	1976			0,50588	
50			27		27	7	0	2012	1733			0,53725	

PCE: Eritrócito policromático; NCE: Eritrócito normocromático; MNPCE: Eritrócito policromático micronucleado; MNNCE: Eritrócito normocromático micronucleado; (1) Desvio Padrão = DP x 100 / média (considerando entre 24 e 33 g).

Tabela 8 – Análise Estatística da Substância Teste e dos Controles Positivo e Negativo no Número de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos (MNPCE's) e a Proporção de PCE / (PCE + NCE) das Células da Medula Óssea de Camundongos (Valores Médios Obtidos de 5 Animais de Cada Sexo/Dose).

Tratamentos (mg kg ⁻¹)	Sexo	MNPCEs/ 2.000 células	Desvio Padrão de MNPCE	PCEs	NCEs	PCE/ (PCE + NCE)
Controle Negativo	M	0,2	0,4	2011,8	1726,8	0,53815
137,5	M	1,0	1,2	2008,2	1748,6	0,53470
275	M	0,2	0,4	2015,0	1700,4	0,54242
550	M	0,4	0,5	2012,4	1746,6	0,53580
Controle Positivo	M	8,4 **	1,1	2025,8	1775,2	0,53326
Controle Negativo	F	0,4	0,5	2013,6	1781,4	0,53106
137,5	F	0,0	0,0	2018,4	1713,0	0,54107
275	F	0,0	0,0	2029,0	1786,8	0,53213
550	F	0,4	0,9	2019,6	1765,4	0,53364
Controle Positivo	F	8,4 **	1,3	2028,2	1856,2	0,52238

* para $p \leq 0,05$ e ** para $p \leq 0,01$: difere estatisticamente do controle negativo (veículo de diluição), pelo teste U por Mann-Whitney (Kruskal & Wallis Test); Palavras-chave: M-machos, F-fêmeas; Controle Positivo = ciclofosfamida a 25 mg kg⁻¹ (p.c.).

Tabela 9 – Análise Estatística da Substância Teste e Controles Positivo e Negativo o Número de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos (MNPCEs) e a Proporção de PCE / (PCE + NCE) das Células da Medula Óssea de Camundongo (Valores Médios Obtidos de 10 Animais, Machos e Fêmeas/Dose).

Tratamentos (mg kg ⁻¹)	MNPCEs/ 2.000 células	Desvio Padrão de MNPCE	PCEs	NCEs	PCE/ (PCE + NCE)
Controle Negativo	0,3	0,5	2012,7	1754,1	0,53460
137,5	0,5	1,0	2013,3	1730,8	0,53789
275	0,1	0,3	2022,0	1743,6	0,53728
550	0,4	0,7	2016,0	1756,0	0,53472
Controle Positivo	8,4 **	1,2	2027,0	1815,7	0,52782

* para $p \leq 0,05$ e ** para $p \leq 0,01$: difere estatisticamente do controle negativo (veículo de diluição), pelo teste U por Mann-Whitney (Kruskal & Wallis Test) Palavras-chave: Controle positivo=ciclofosfamida a 25 mg kg⁻¹ (p.c.).



BIOAGRI
a Mérieux NutriSciences Company

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13

original

Título do estudo: Avaliação de Toxicidade Oral Aguda da Substância teste GREENTEX OPF-S 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.

Diretora de estudo: Kátia Fernanda Claudino Bastelli

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 – S.P. – Brasil
www.bioagri.com.br; bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador: **GREENTEX QUÍMICA LTDA**
Rua Geni Spiner nº 45 Bairro Bela Vista CEP: 89110-000
Fone: (47) 3397-2183
Gaspar – SC – Brasil

Conclusão do Relatório: 06/Fev/2014

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13

Declaração de acompanhamento do estudo


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

Sua condução usou como base os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) da Norma N° NIT-DICLA-035-(Rev. 02). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Set/2011 e da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17.

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

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

Os documentos e registros gerados neste estudo serão mantidos nos arquivos da BIOAGRI por um período de 10 anos.


Kátia Fernanda Claudino Bastelli
Diretora de Estudo
Fone: (19) 3429-7700

06 / Fev / 2014
dd mmm aaaa


Edivan Tonhi
Gerente da Instalação de Teste
Fone: (19) 3429-7700

06 / Fev / 2014
dd mmm aaaa


Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13
Declaração da Garantia da Qualidade

O relatório foi inspecionado pela Garantia da Qualidade (GQ) – BIOAGRI. As datas e fases de inspeções no estudo estão relacionadas abaixo:

Inspeção		Data das Informações Relatadas	
Data	Fase	Diretor de Estudo	Gerente da Instalação de Teste
30/Set/2013	Plano de Estudo	30/Set/2013	30/Set/2013
10/Out/2013	RAS 178/13 Preparo da amostra, preparo de soluções, diluições, sistema teste, quarentena/aclimatação do sistema teste, preparo do sistema teste, seleção da dose inicial, delineamento experimental, pesagem do sistema teste, aplicação da substancia teste, período de observação, eutanásia e necropsia dos animais.	11/Out/2013	11/Out/2013
04/Fev/2014	Relatório do Estudo	04/Fev/2014	04/Fev/2014

A inspeção de processo mais recente da fase laboratorial desta classe de estudo foi realizada em 10 de Outubro de 2013. Esta inspeção esta registrada no documento interno **RAS 178/13**. As datas onde o Diretor de Estudo e Gerente da Instalação de Teste foram informados estão descritas no quadro acima.

Os resultados e observações apresentados neste Relatório de Estudo são uma descrição precisa dos dados brutos gerados durante a condução do estudo. Todos os dados brutos gerados durante a condução do estudo foram inspecionados, bem como emendas e desvios aos planos de estudo.


 Luis Paulo Fava
 Insp. da Garantia da Qualidade

Garantia da Qualidade
 Fone: (19) 3429-7700

06 / Fev, 2014 .
 dd mmm aaaa

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13
1. Informações
1.1. Do estudo

Início do estudo:	08/Jan/2014
Início da fase experimental:	08/Jan/2014
Final da fase experimental:	23/Jan/2014
Conclusão do relatório:	06/Fev/2014
Número da proposta:	00204/13 Rev. 00
Corpo técnico:	Diretora de Estudo: Kátia Fernanda Claudino Bastelli Pesquisador: Alexandre Tiago Visentin Dorelli Técnico de laboratório: Danilo Nascimento de Lima Ajudante de laboratório: Luis Fernando Travaioli Auxiliar de laboratório: Sandra Regina Bombo

1.2. Da substância teste

Substância teste:	GREENTEX OPF-S	
Recebida em:	15/Out/2013	
Lote:	12973	
Data de fabricação:	10/Out/2013	
Data de validade:	10/Out/2015	
Código da Bioagri:	SAN-2338/13	
Aspecto físico:	Líquido	
Composição declarada (%) (patrocinador):	Hexametáfosfato de Sódio	41,25
	Fosfato Monossódico Anidro	13,75
Nome do Ativo:	Fosfato	
Substância teste enviada por:	GREENTEX QUÍMICA LTDA	

2. Objetivo

O objetivo é avaliar a toxicidade oral aguda em ratos da substância teste GREENTEX OPF-S

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 da substância teste.

Dose: é a quantidade da substância teste administrada ao animal durante o teste, expressa em unidade de peso da substância teste em relação à unidade de peso corpóreo do animal (mg.kg^{-1}).

DL₅₀ Oral (Dose Letal 50%): é uma única dose da substância 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 da substância teste por unidade de massa de peso corpóreo do animal teste (mg.kg^{-1}).

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 OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) nº 423 (2001), baseando-se nos PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Set/2011 e da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17 e Procedimento Operacional Padrão da Bioagri Laboratórios Ltda., POP-M 854 (Teste de Toxicidade Oral Aguda em Ratos - (423) Método Clássico OECD, Rev. 06).

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13

4.1. Seleção do sistema-teste

No estudo foram utilizados ratos jovens adultos saudáveis (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com idade de 10, 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. 05) e POP-M 0825 (Rev. 09).

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.

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 da substância 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. 09). 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: Presence; Marca: Evalis do Brasil Nutrição Animal Ltda.) 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 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.

4.4. Preparo da substância teste

A substância teste foi administrada pura.

4.5. Dose utilizada

A dose inicial foi de 2000 mg da substância teste pura / 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 substância teste pura / kg de peso corpóreo (2º tratamento), para confirmação dos resultados.

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13

4.6. Administração da substância teste

O volume da substância 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 da substância teste ser administrada (1º dia), no 7º dia após a administração da substância teste, e no final do tratamento (14º dia).

4.8. Observações dos sinais clínicos

Os animais foram observados individualmente após receberem a dose da substância 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. Quando há animais que apresentam condições moribundas, sinais de sofrimento e estresse, estes são humanamente eutanasiados. Nos casos de animais eutanasiados, bem como no caso dos animais encontrados mortos, o tempo de morte foi precisamente registrado.

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 06).

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 a substância teste na dose de 2000 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, conforme Tabela 1.

Relatório do Estudo: RE. 409.0121.13
Tabela 1. Sexo, peso dos animais e volume aplicado da substância 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		196,67	208,52	221,40	2000	0,25
2		187,04	183,94	201,91		0,24
3		180,86	198,48	213,20		0,23
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		201,68	215,98	227,43	2000	0,26
2		189,38	180,30	200,37		0,24
3		199,80	229,12	232,55		0,25

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
2	03	2000	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 da substância teste.

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

Os resultados obtidos com a substância 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 da substância teste.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e em conformidade com a metodologia utilizada, a substância teste GREENTEX OPF-S apresenta a DL₅₀ oral superior a 2000 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo.

7. Referências Bibliográficas

Norma Nº NIT-DICLA-035-(Rev. 02). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Rio de Janeiro. p 19. Set/2011.

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

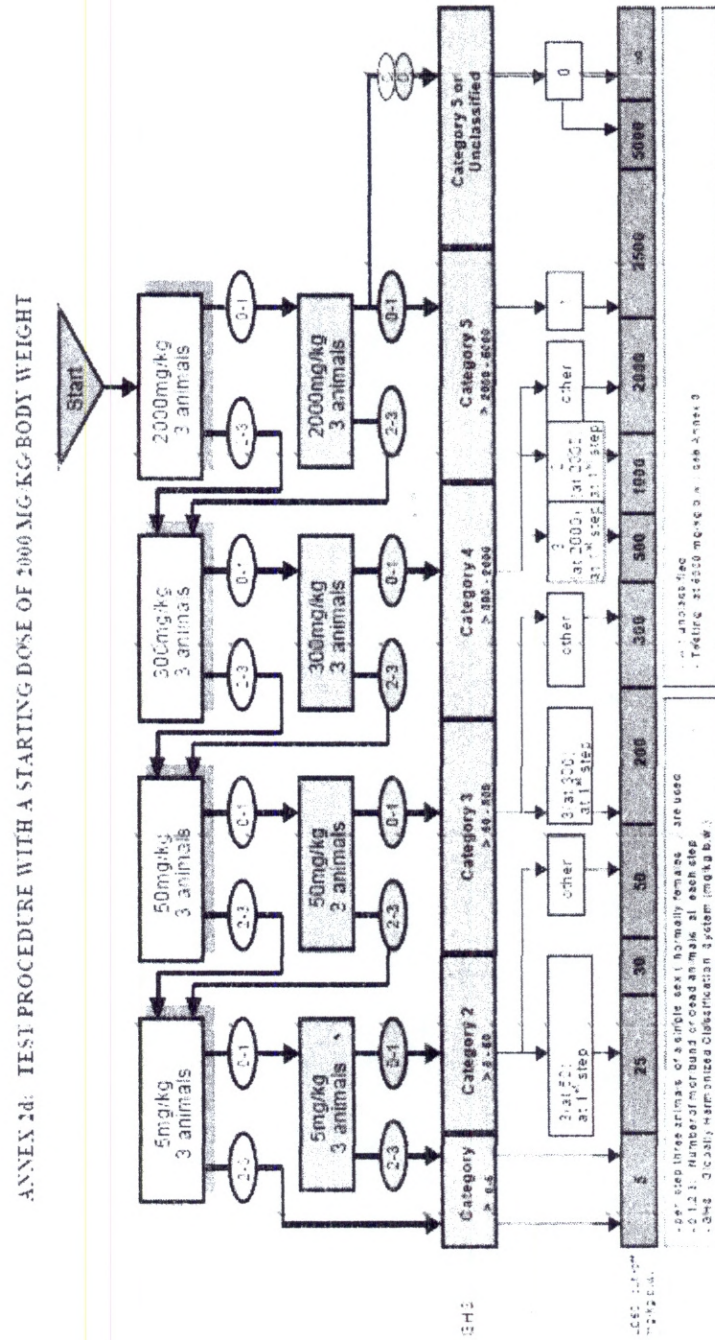


Figura 1. Esquema de classificação segundo OECD (423, 2001), iniciando com 2000 mg.kg⁻¹ da substância teste por peso corpóreo do animal.

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13

Título do estudo: **Avaliação de Toxicidade Cutânea Aguda da Substância teste GREENTEX OPF-S em Ratos**



Metodologia: ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.
Guideline of testing of chemicals: Section 4: Health Effects: Acute dermal toxicity - 402. Paris: Adopted: 24 Feb 1987, p.1-7.

Diretora de estudo: **Kátia Fernanda Claudino Bastelli**

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 – S.P. – Brasil
www.bioagri.com.br; bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador: **GREENTEX QUÍMICA LTDA**
Rua Geni Spiner 45 Bairro Bela Vista CEP: 89110-000
Fone: (47) 3397-2183
Gaspar – SC – Brasil

Conclusão do Relatório: **08/Jan/2014**

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13**Declaração de acompanhamento do estudo**

O estudo descrito neste Relatório do Estudo foi executado sob minha supervisão, de acordo com o Plano de Estudo e procedimentos descritos no Guideline 402 da Organisation for Economic and Co-operation and Development (OECD, 1987).

Sua condução usou como base os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) da Norma N° NIT-DICLA-035-(Rev. 02). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Set/2011 e da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17.

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

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

Os documentos e registros gerados neste estudo serão mantidos nos arquivos da BIOAGRI por um período de 10 anos.



Kátia Fernanda Claudino Bastelli
Diretora de Estudo
Fone: (19) 3429-7700

08 / Jan / 2014
dd mmm aaaa



Paulo Marcos da Silva
Gerente da Instalação de Teste
Fone: (19) 3429-7700

08 / Jan / 2014
dd mmm aaaa

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13
Declaração da Garantia da Qualidade

O relatório foi inspecionado pela Garantia da Qualidade (GQ) – BIOAGRI. As datas e fases de inspeções no estudo estão relacionadas abaixo:

Inspeção		Data das Informações Relatadas	
Data	Fase	Diretor de Estudo	Gerente da Instalação de Teste
30/Set/2013	Plano de Estudo	30/Set/2013	30/Set/2013
16/Out/2013	RAS 180/13 Preparo da amostra, preparo de soluções, diluições, sistema teste, quarentena/aclimatação do sistema teste, preparo do sistema teste, nível de dose, aplicação da substância teste, período de observação, período de observação, eutanásia e necropsia dos animais.	17/Out/2013	18/Out/2013
30/Dez/2013	Relatório do Estudo	08/Jan/2014	30/Dez/2013

A inspeção de processo mais recente da fase laboratorial desta classe de estudo foi realizada em 16 de Outubro de 2013. Esta inspeção esta registrada no documento interno **RAS 180/13**. As datas onde o Diretor de Estudo e Gerente da Instalação de Teste foram informados estão descritas no quadro acima.

Os resultados e observações apresentados neste Relatório de Estudo são uma descrição precisa dos dados brutos gerados durante a condução do estudo. Todos os dados brutos gerados durante a condução do estudo foram inspecionados, bem como emendas e desvios aos planos de estudo.


 Luis Paulo Fava
 Insp. da Garantia da Qualidade

Garantia da Qualidade
 Fone: (19) 3429-7700

08 / Jan / 2014
 dd mmm aaaa

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13
1. Informações
1.1. Do estudo

Início do estudo:	04/Dez/2013
Início da fase experimental:	04/Dez/2013
Final da fase experimental:	19/Dez/2013
Conclusão do relatório:	08/Jan/2014
Número da proposta:	00204/13
Corpo técnico:	Diretora de Estudo: Kátia Fernanda Claudino Bastelli Pesquisadora: Daniela Ferraz Menezes Técnico de laboratório: Danilo Nascimento de Lima Ajudante de laboratório: Luis Fernando Travaoli Auxiliar de laboratório: Sandra Regina Bombo

1.2. Da substância teste

Substância teste:	GREENTEX OPF-S
Recebida em:	15/Out/2013
Lote:	12973
Data de fabricação:	10/Out/2013
Data de validade:	10/Out/2015
Código da Bioagri:	SAN-2338/13
Aspecto físico:	Líquido
Composição declarada (%) (patrocinador):	Hexametafosfato de Sódio 41,25% Fosfato Monossodico Anidro 13,75%
Substância teste enviada por:	GREENTEX QUÍMICA LTDA

2. Objetivo

O objetivo é avaliar a toxicidade cutânea aguda da substância teste GREENTEX OPF-S 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 da substância teste.

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

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

Teste limite: é o teste conduzido com um nível de dose de no mínimo 2000 mg.Kg^{-1} de peso corpóreo em um grupo de animais, constituído de 5 machos e 5 fêmeas.

4. Material e métodos

O estudo foi conduzido pelo método OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) nº 402 (1987), descrito no procedimento POP-M 0852 (Rev. 06) – Teste de Toxicidade Cutânea Aguda em Ratos, baseando-se nos PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Set/2011 e da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17.

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13

4.1. Seleção do sistema-teste

No estudo foram utilizados ratos jovens adultos saudáveis (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, idade de 09 e 12 semanas, pesando entre 200 e 300 g, 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. 05) e POP-M 0825 (Rev. 09).

4.2. Justificativa da seleção do sistema-teste

O rato é a espécie mais comumente usada para teste de toxicidade cutânea 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).

4.3. 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.

4.4. Preparo do sistema-teste

Para o estudo foram selecionados 10 ratos, 5 machos e 5 fêmeas nulíparas e não prenhas, adultos jovens. 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.

Aproximadamente 24 horas antes da aplicação da substância teste, com o auxílio de uma máquina de tosa, depilou-se uma área de não menos que dez por cento da região do dorso dos animais, tomando-se o cuidado para não provocar lesões na pele dos mesmos.

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 ($\pm 3^\circ\text{C}$), 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 a trocas de ar programadas para 10 a 15/hora.

Ração comercial peletizada 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 da substância teste

A substância teste foi administrada pura.

4.7. Dose utilizada

A substância teste pura foi administrada na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo.

4.8. Peso corpóreo

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

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13
4.9. Observações dos sinais clínicos

Os animais foram observados individualmente após receberem a dose da substância 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 da substância 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. Os animais que apresentaram condições moribundas, sinais de sofrimento e estresse foram humanamente eutanasiados. Nos casos de animais eutanasiados, bem como no caso dos animais encontrados mortos, o tempo de morte foi registrado. Os achados anatomopatológicos macroscópicos também foram registrados.

4.10. 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. 06).

4.11. 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 da substância teste. A Tabela 1 apresenta o peso, sexo dos animais e quantidade de substância teste aplicada durante o período do estudo.

Tabela 1. Peso e sexo dos animais, e volume aplicado na dose de 2000 mg da substância teste/ kg de peso corpóreo.

Número dos Animais	Peso dos Animais (g)			Sexo dos Animais	Volume aplicado (mL)
	Inicial	7º dia	Final		
1	244,34	249,96	259,70	♂	0,31
2	251,66	256,79	265,28	♂	0,32
3	249,36	255,36	264,79	♂	0,31
4	242,23	248,60	259,02	♂	0,31
5	258,14	265,02	274,89	♂	0,33
6	209,27	215,71	224,93	♀	0,26
7	203,15	210,03	221,12	♀	-0,26
8	208,51	214,17	225,03	♀	0,26
9	207,48	213,66	222,70	♀	0,26
10	208,41	215,09	224,93	♀	0,26

Relatório do Estudo: RE. 440.0031.13

A Tabela 2 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 dose (teste limite).

Tabela 2. Número de animais mortos por dia durante o período do estudo.

Nº de animais	Período de Avaliação (dias)														Número de animais mortos	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, a substância teste GREENTEX OPF-S apresenta DL₅₀ cutânea superior a 2000 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo.

7. Referências Bibliográficas

Norma Nº NIT-DICLA-035-(Rev. 02). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Rio de Janeiro. p 19. Set/2011.

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.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline of testing of chemicals: Section 4: Health Effects: Acute dermal toxicity - 402**. Paris: Adopted: 24 Feb 1987, p.1-7.

Fim do
relatório

RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL EM RATOS 90 DIAS – DOSES REPETIDAS"
F90 – 033054.M

Cliente: GREENTEX QUIMICA LTDA.
Endereço: RUA GENI SPINNER, 45 - BELA VISTA 89110-000
GASPAR - SC
Protocolo Ecolyzer: 033054.M
Início do Processo: 09/10/2015
Recebimento da Amostra: 09/10/2015
Início do Ensaio: 15/11/2015
Término do Ensaio: 15/03/2016
Emissão do Relatório: 22/03/2016
Amostra: GREENTEX OPF
Composição Química Declarada: Não declarada
Quantidade de amostra recebida (mL ou g): 500,00
Lote/Val./Fab. Declarada: 14488 24/09/2016 24/09/2015
Quantidade de amostra utilizada (mL ou g): Solido Homogêneo Opaço Branco

RESUMO

Foi conduzido o ensaio de Toxicidade oral em ratos 90 dias – Doses repetidas para estudar os possíveis efeitos tóxicos da substância teste. A substância teste foi utilizada diluída na concentração de 500mg/mL em água deionizada e administrada, por via oral, a ratos de 4 a 6 semanas de idade no início do experimento, nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg de P.V. Os animais foram observados quanto ao tempo em que vieram a óbito, alterações comportamentais, sinais clínicos e achados anatomopatológicos macroscópicos e microscópicos. A substância teste GREENTEX OPF foi considerada não tóxica quando aplicada por via oral em ratos.

INTRODUÇÃO

Toxicidade oral constitui-se na soma de efeitos adversos ocorridos em um espaço de tempo após aplicações via oral de doses repetidas da substância-teste.

Dose é a quantidade de substância administrada. A dose é expressa como peso da substância por unidade do peso do animal testado (ex: mg/Kg).

OBJETIVO

O ensaio de Toxicidade oral em ratos 90 dias – Doses repetidas tem como finalidade avaliar as características toxicológicas de uma substância, fornecendo informações sobre os riscos à saúde de uma exposição por via oral.

RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL EM RATOS 90 DIAS – DOSES REPETIDAS"
F90 – 033054.M

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Equipamentos

- Balança Digital
- Sonda rígida
- Seringa descartável
- Centrífuga.
- Lâmina de vidro.
- Microscópio.
- Óleo de imersão.
- Pipeta Pasteur.
- Placa de Petri descartável.
- Tubo cônico.
- Vidrarias de uso comum de laboratório.

Substância teste e níveis de dose.

A substância teste originalmente na forma pó foi utilizada diluída na concentração de 500mg/mL em água deionizada. Para o controle negativo foi utilizada somente água deionizada.

- Dose 01: concentração de 500 mg/mL (dose de 125 mg/Kg).
- Dose 02: concentração de 500 mg/mL (dose de 250 mg/Kg).
- Dose 03: concentração de 500 mg/mL (dose de 500 mg/Kg).
- Controle: concentração de 1000 mg/mL (dose de 500 mg/Kg).

Sistema teste.

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, jovens com idade entre 4 a 6 semanas no início do experimento, possuindo os machos de 71 a 83 g e as fêmeas nulíparas e não prenhes de 65 a 74 g de peso vivo. Foram utilizados 20 animais para cada dose, sendo 10 de cada sexo. Para o grupo controle negativo foram utilizados 20 animais, sendo 10 de cada sexo.

Condições de teste

Os animais foram aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. Foram mantidos com ventilação de 10 a 15 trocas de ar por sala por hora, temperatura entre 19 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 30 e 70 % e fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A dieta foi constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. Os animais foram distribuídos inteiramente ao acaso em caixas de polipropileno, cobertas por grade metálica e forradas com maravalha de madeira, com número máximo de 5 animais por caixa.

RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL EM RATOS 90 DIAS – DOSES REPETIDAS"
F90 – 033054.M

Metodologia

Os animais foram pesados diariamente; e então após os cálculos para se determinar as doses utilizadas, a substância teste foi administrada aos animais por via oral em doses repetidas nas seguintes doses: 125, 250 e 500mg/Kg de PV (peso vivo).

Os animais foram observados diariamente, durante 90 dias de aplicações da substância e avaliados clinicamente, sendo anotados o início, grau e duração dos sintomas. Estes achados foram baseados principalmente nos exames de pele, pêlos, olhos, mucosas, sistemas circulatório, respiratório, nervoso, atividade somatomotora e comportamental. Os animais foram pesados diariamente a partir do início até final do experimento. Os sobreviventes foram eutanasiados e necropsiados aos 90 dias de teste.

A necropsia de todos animais em teste foi realizada, com especial atenção aos exames microscópicos e macroscópicos dos órgãos coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, rins, baço e glândulas supra renais.

RESULTADO

Número de mortes.

- Dose 01: (dose de 125 mg/Kg): 00
- Dose 02: (dose de 250 mg/Kg): 00
- Dose 03: (dose de 500 mg/Kg): 00
- Controle: (dose de 500 mg/Kg): 00

Intervalo de Confiança a 95%.

- Não calculado.

Sinais clínicos.

- Dose 1 (dose de 125 mg/Kg): Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade.
- Dose 2 (dose de 250 mg/Kg): Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade.
- Dose 3 (dose de 500 mg/Kg): Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade.
- Dose Controle: Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade.

Anatomopatológico (macroscópico).

Animais que vieram a óbito:

- Nenhum animal veio a óbito após administrações da substância teste.

Sobreviventes:

- Sistema respiratório: NDN até a dose de 125 mg/Kg de P.V.
- Sistema cardio-vascular: NDN até a dose de 125 mg/Kg de P.V.
- Sistema nervoso central: não pesquisado.
- Sistema digestório: NDN até a dose de 125 mg/Kg de P.V.
- Sistema gênito urinário: NDN até a dose de 125 mg/Kg de P.V.
- Outros (fígado e baço): NDN até a dose de 125 mg/Kg de P.V.

RELATÓRIO FINAL
"TOXICIDADE ORAL EM RATOS 90 DIAS – DOSES REPETIDAS"
F90 – 033054.M


- Sistema respiratório: NDN até a dose de 250 mg/Kg de P.V.
 - Sistema cardio-vascular: NDN até a dose de 250 mg/Kg de P.V.
 - Sistema nervoso central: não pesquisado.
 - Sistema digestório: NDN até a dose de 250 mg/Kg de P.V.
 - Sistema gênito urinário: NDN até a dose de 250 mg/Kg de P.V.
 - Outros (fígado e baço): NDN até a dose de 250 mg/Kg de P.V.
-
- Sistema respiratório: NDN até a dose de 500 mg/Kg de P.V.
 - Sistema cardio-vascular: NDN até a dose de 500 mg/Kg de P.V.
 - Sistema nervoso central: não pesquisado.
 - Sistema digestório: NDN até a dose de 500 mg/Kg de P.V.
 - Sistema gênito urinário: NDN até a dose de 500 mg/Kg de P.V.
 - Outros (fígado e baço): NDN até a dose de 500 mg/Kg de P.V.

OBS: NDN = Nada Digno de Nota

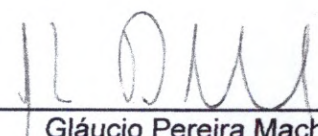
CONCLUSÃO

A substância teste GREENTEX OPF não apresentou toxicidade para ratos machos e fêmeas brancos, quando administrada diluída na concentração de 500mg/mL em água deionizada e aplicada, por via oral, nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg de P.V. O que permite classificar a substância teste como não tóxica quando aplicada por via oral em ratos.

- Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.
- Amostragem realizada pelo cliente.
- As amostras foram analisadas como recebidas, isentando o laboratório de qualquer responsabilidade referente aos procedimentos e dados de amostragem, preservação e envio das amostras.
- Este relatório atende os requisitos da NBR ISO/IEC 17025, o qual garante a rastreabilidade dos dados gerados no ensaio.
- É proibida a reprodução parcial deste Relatório. A reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.
- Ensaio executado pela Ecolyzer Serviços Laboratoriais Ltda. Resende – RJ.



Diego Salgado de Almeida
Analista Responsável
CRMV-RJ 10913



Gláucio Pereira Machado
Gerente Técnico
CRMV-SP 20396

MÉTODO UTILIZADO

OECD, Guideline For Testing Of Chemicals, **Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents**, Section 4: Health Effects, 408, 21/10/1998. Pág. 1-10.

=====

**Laudo de Atendimento aos Requisitos de Saúde
LARS nº 4421-PQT33-338-17**

**Avaliação da Conformidade de Produtos Químicos Utilizados no Tratamento de Água para
Consumo Humano – NBR 15.784 (2017)**

Identificação da substância teste: Greentex OPF Liq.

Nome químico do ingrediente ativo (IUPAC): Hexametáfosfato de sódio
Nome comum do ingrediente ativo: Hexametáfosfato de sódio
Nº CAS do ingrediente ativo: 10124-56-8
Estado físico: Líquido
Fabricante: Greentex Química Ltda
Unidade de Produção: Rua Geni Spinner, 45 - Bela Vista - Gaspar - SC - CEP 89110-000
Nº do lote: 17080102
Data de fabricação: 01/08/2017
Data da coleta: 04/08/2017
Data de validade do estudo: 04/09/2019
Responsável pela coleta da amostra: NSF Bioensaios

Patrocinador (Fornecedor): Greentex Química Ltda
 Rua Geni Spinner, 45 - Bela Vista - Gaspar - SC - CEP 89110-000

Identificação do Laboratório: NSF Bioensaios - Prestação de Serviços de Análises e Certificação Ltda.
 Rua Palermo, 257 - Santa Isabel - Viamão - RS - CEP 94480-775

Nº do Reconhecimento: BPL 0006
Validade do Certificado BPL da CGCRE: Consultar o site www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/certificados/
Nº do Relatório de Estudo (RE): 4421-PQT33-338-17
Data de Término do Estudo: 04/09/2017

Dosagem Máxima de Uso (DMU): 20 mg/L

Resultados Analíticos e Avaliação:

PARÂMETRO	AVALIAÇÃO
Impurezas metálicas	Aprovado
Fluoreto	Aprovado
Radionuclídeos	Aprovado

Declaração de Conformidade

Declaro que este Laudo de Atendimento aos Requisitos de Saúde - LARS reflete os Dados Brutos obtidos no Relatório de Estudo nº 4421-PQT33-338-17, o qual, foi conduzido de acordo com os Princípios de Boas Práticas de Laboratório, Normas NIT-DICLA-035 a 041 (Set/2011), baseados na OECD – Principles on Good Laboratory Practice (1997).

Declaro que para a elaboração do Plano de Estudo que fundamentou o RE Nº 4421-PQT33-338-17 foram considerados todos os analitos químicos específicos pertinentes que estão relacionados nas Tabelas 1 a 4, bem como outros dependentes da formulação do produto, do processo de fabricação e das matérias primas empregadas, conforme estabelecido na NBR 15.784, em especial no item 5.8 O presente Estudo visa o atendimento às exigências contidas na alínea b), inciso III, artigo 13º da Portaria 2914, de 12/12/2011, do Ministério da Saúde.

04/09/17
 Data



 Everton Melo dos Santos
 Químico - CRQ-05202490-5ª Região
 Diretor de Estudo



Relatório Final

Avaliação da Conformidade de Produtos Químicos para Tratamento de Água Greentex OPF Liq.

Em conformidade com ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15784
“Produtos químicos utilizados no tratamento de água para consumo humano – Efeitos
a Saúde - Requisitos.” (2017)

Número do estudo: 4421-PQT33-338-17
Substância teste: Greentex OPF Liq.
Número da substância teste: 4421
Lote da substância teste: 17080102
Fabricante: Greentex Química Ltda
Rua Geni Spinner, 45 - Bela Vista - Gaspar - SC
CEP 89110-000
Patrocinador: Greentex Química Ltda
Rua Geni Spinner, 45 - Bela Vista - Gaspar - SC
CEP 89110-000
Laboratório executor: NSF Bioensaios - Prestação de Serviços de Análises e
Certificação Ltda.
Rua Palermo, 257 - Santa Isabel - Viamão - RS
CEP 94480-775
Gerente do laboratório: Edivan Tonhi
Diretor de estudo: Everton Melo dos Santos
Gerente da qualidade: Aline Garcia dos Santos

Estudo: 4421-PQT33-338-17
Avaliação da Conformidade de Produtos Químicos para Tratamento de Água – Greentex OPF Liq.
Página 1 de 8

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE BPL

Estudo: Avaliação da Conformidade de Produtos Químicos para Tratamento de Água –
Greentex OPF Liq.
Nº do Estudo: 4421-PQT33-338-17

Declaro que os objetivos estabelecidos no Plano de Estudo foram alcançados e concluídos com êxito; que os dados gerados são válidos; e que o Relatório Final reflete os procedimentos utilizados e os Dados Brutos obtidos no Estudo.

Declaro que o Estudo foi conduzido de acordo com os princípios de Boas Práticas de Laboratório - BPL, normas NIT-DICLA-035 a 041 (Set/11) baseadas na OECD - Principles on Good Laboratory Practice (1997).

Declaro que os princípios BPL foram plenamente atendidos.

Viamão, 04 / 09 / 2017 .



Everton Melo dos Santos
Diretor de Estudo
Rua Palermo, 257 - Viamão - RS

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Estudo: Avaliação da Conformidade de Produtos Químicos para Tratamento de Água –
Greentex OPF Liq.

Nº do Estudo: 4421-PQT33-338-17

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

Declaro que o Diretor de Estudo assinou a declaração de que o Estudo foi conduzido segundo os princípios BPL em 04/09/2017.

Declaro que foram realizadas inspeções, conforme especificado na tabela abaixo, não sendo observados desvios ou não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados obtidos.

Objeto da Inspeção	Data da inspeção	Data de relato ao DE	Data de relato à GIT
Plano de Estudo	14/08/17	14/08/17	14/08/17
<i>Fases do estudo *</i>			
Preparo de soluções	30/01/17	02/02/17	02/02/17
Análise de VOC	31/01/17	02/02/17	02/02/17
Análise de metais (Mercúrio)	01/02/17	02/02/17	02/02/17
Análise de metais	02/02/17	02/02/17	02/02/17
Equipamentos / registros	30 e 31/01/17 01 e 02/02/17	02/02/17	02/02/17
Dados Brutos	04/09/17	04/09/17	04/09/17
Relatório Final	04/09/17	04/09/17	04/09/17

DE: Diretor de Estudo; GIT: Gerência da Instalação de Teste.

* Inspeção de processo baseada na Inspeção do estudo 4192-PQT01-053-17.

Viamão, 04 / 09 / 2017.

Rodrigo dos Santos
Rodrigo Garcia dos Santos
Setor de Garantia da Qualidade
Rua Palermo, 257 - Viamão - RS

1. INTRODUÇÃO

Produtos químicos utilizados para o tratamento de água para consumo humano, dependendo de sua procedência ou composição, podem introduzir a água características indesejáveis e/ou prejudiciais à saúde humana. Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de requisitos para o controle de impurezas destes produtos.

O presente relatório descreve os procedimentos e apresenta os resultados das análises realizadas para avaliação de produtos químicos utilizados em tratamento de água potável, visando o atendimento às exigências contidas na alínea b), inciso III, artigo 13º da Portaria 2914, de 12/12/2011, do Ministério da Saúde. A avaliação seguiu os critérios da norma "ABNT NBR 15784 (2017) – Produtos químicos utilizados no tratamento de água para consumo humano – Efeitos a saúde – Requisitos" e foram conduzidas observando os critérios de Boas Práticas de Laboratório atendendo as condições necessárias para trabalhos de certificação de produtos.

1.1. Dados do estudo

Plano de estudo	:	14/08/2017
Início do ensaio	:	14/08/2017
Término do ensaio	:	30/08/2017
Término do estudo	:	04/09/2017

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Substância teste

Nome da substância teste	:	Greentex OPF Liq. ⁽¹⁾
Recebido em	:	11/08/2017
Identificação NSF Bioensaios	:	4421
Nome comum do i.a.	:	Hexametáfosfato de sódio ⁽¹⁾
Nome químico do i.a. (IUPAC)	:	Hexametáfosfato de sódio ⁽¹⁾
CAS do i.a.	:	10124-56-8 ⁽¹⁾
Lote da substância teste	:	17080102 ⁽¹⁾
Fabricação da substância teste	:	01/08/2017 ⁽¹⁾
Validade da substância teste	:	01/02/2018 ⁽¹⁾
Estabilidade	:	Estável por seis meses a temperatura ambiente
Dose máxima de uso (DMU)	:	20 mg/L ⁽¹⁾
Estado físico	:	Líquido ⁽¹⁾
Data da Coleta	:	04/08/2017
Representatividade da amostra (coleta e amostragem):	:	A coleta da substância teste foi realizada pela NSF Bioensaios, conforme item 8.2 amostras líquidas - NBR 15784:2017. Sendo a amostra coletada representativa do lote: 17080102.
Fabricante	:	Greentex Química Ltda ⁽¹⁾
Composição química declarada (Patrocinador)	:	35% de Hexametáfosfato de sódio ⁽¹⁾
Homogeneidade	:	Visualmente homogêneo
Data de abertura da embalagem	:	14/08/2017

(1) Fonte: Informações fornecidas pelo patrocinador Greentex Química Ltda.

2.2. Equipamentos utilizados

Equipamentos

- Balança analítica Shimadzu AY220.
- Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma / ICP-OES, Optima 7300 DV.
- Contador de Gás Proporcional LB 4200.
- pHmetro Denver, Modelo Up-25.
- Cromatógrafo Iônico - METROHM 881 COMPACT IC PRO.

2.3. Substâncias de referência

Padrão	Marca	Validade	Lote
Fluoreto	Inorganic Ventures	04/11/2018	J2F01070
Mix metais	*	20/09/2017	SM-127
Mix metais	*	14/02/2018	SM-135

* O mix de metais, utilizado na determinação do parâmetro impurezas metálicas na data de 30/08/2017, foi preparado no laboratório utilizando-se as substâncias de referência descritas abaixo:

Padrão	Marca	Validade	Lote
Antimônio	Accu Standard	01/02/2018	213015078
Alumínio	Accu Standard	01/12/2017	212125075
Arsênio	Accu Standard	01/01/2018	2130150086
Bário	Ultra Scientific	30/11/2017	L01214
Berílio	Accu Standard	01/06/2020	215065066
Cádmio	Accu Standard	21/03/2021	21603544
Chumbo	Accu Standard	01/01/2018	213015086
Cobre	Accu Standard	01/09/2019	214095086
Cromo	Accu Standard	17/12/2020	215125102
Ferro	Accu Standard	22/07/2018	213075097
Manganês	Accu Standard	01/09/2018	213095040
Mercúrio	Accu Standard	19/04/2021	216045054
Níquel	Accu Standard	14/10/2020	215095205
Selênio	Expexertificate	09/09/2017	21-151SEY
Tálio	Accu Standard	01/03/2019	214035059
Zinco	Inorganic Ventures	08/05/2020	K2-ZN650949

2.4. Metodologia

2.4.1. Ensaio do produto em condições de laboratório

Os ensaios foram realizados em duplicata e um branco controle foi realizado para cada bateria de análise sendo tratado da mesma forma que as amostras, a fim de verificar possíveis contaminações no processo e a qualidade dos reagentes utilizados.

A amostra de substância teste foi representativa do produto comercializado, ficando a cargo do fornecedor estabelecer a representatividade da amostragem, bem como, estabelecer a dosagem máxima de uso recomendado do produto.

A preparação das soluções de análise foi realizada conforme o método A, seção 9.2 da norma ABNT NBR 15784 (2017), descrita a seguir:

Diluiu-se a amostra a uma concentração equivalente a 10 vezes a dosagem máxima de uso do produto, utilizando água reagente. Calculou-se a massa da amostra de acordo com a equação:

$$m_{am} = DMU \times V \times 10$$

A amostra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL para análise de impurezas metálicas, 100 mL para análise de fluoreto e 100 mL para análise de radionuclídeos.

2.4.2. Padronização

A concentração das impurezas detectadas nas soluções de análise foi ajustada para refletir a concentração destas na água de consumo humano, de acordo com as seguintes equações:

$$CIPA = \frac{CID \times DMU}{C_{sol}} \quad CIPA = \frac{CID \times 20 \text{ mg/L}}{200}$$

Onde:

CID é a concentração da impureza detectada na análise laboratorial, expressa em mg/L.

Csol é a concentração da solução preparada pelo laboratório, expressa em mg/L.

CIPA é a concentração da solução da impureza padronizada na água para consumo humano, cujo resultado deve ser comparado com a CIPP (concentração máxima permitida de uma determinada impureza, resultante da adição de um único produto à água para consumo humano).

2.4.3. Avaliação

O produto foi avaliado através de comparação entre CIPA e CIPP.

$CIPA \leq CIPP$ o produto é aprovado, $CIPA > CIPP$ o produto é reprovado.

2.4.4. Preparação da solução de análise para determinação de impurezas metálicas

2.4.4.1. Alumínio, Antimônio, Arsênio, Bário, Berílio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Ferro, Manganês, Níquel, Selênio, Tálcio e Zinco

A solução obtida no item 2.4.1 foi utilizada na determinação dos elementos Al, Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Se, Tl e Zn por ICP-OES conforme Standard Methods 3120 B.

2.4.4.2. Mercúrio

Uma alíquota de 100 mL da solução preparada conforme item 2.4.1 foi transferida para um frasco Winkler, ao qual foram adicionados 5 mL de H_2SO_4 PA, 2,5 mL de HNO_3 PA e 15 mL de $KMnO_4$ 5% (m/v). Após 15 minutos de repouso adicionou-se 8 mL de $K_2S_2O_8$ 5%. A mistura foi então aquecida ($95 \pm 5^\circ C$) em banho-maria por 2 horas. Decorrido este período a solução foi resfriada a temperatura e tratada com 4 mL de cloridrato de hidroxilamina 12% para reduzir o excesso de permanganato.

A solução assim obtida foi utilizada na determinação de Mercúrio por geração de vapor frio, segundo Standard Methods 3112 B.

2.4.5. Análise de Fluoreto

A análise de íons fluoreto é realizada em cromatógrafo iônico com coluna Metrosep A Supp 7 150/4,0 e utilizando como efluente uma solução de composição 3,6 mM Na_2CO_3 .

2.4.6. Preparo das amostras líquidas para ensaio de radioatividade alfa e beta global

Em um béquer, foram colocados 0,1L da amostra a ser analisada. Evaporado o volume de amostra em chapa de aquecimento até quase seca e a seguir foram adicionados 1mL de HNO_3 1 N e transferida para uma placa de leitura, a amostra residual foi seca num forno a $105^\circ C$ por 1 hora e resfriada em dessecador.

3. RESULTADOS

A média dos resultados normalizados (CIPA) e os valores da Concentração de Impureza Permissível por Produto (CIPP) baseados na NSF/ANSI 60:2016, obtidos para o produto, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de CIPA e CIPP dos parâmetros avaliados

Parâmetro	CIPP (mg/L)	CIPA (mg/L)	Limite de Detecção Normalizado (mg/L)	Avaliação
Impurezas metálicas				
Alumínio	0,02	ND	0,003	Aprovado
Antimônio	0,0005	ND	0,0003	Aprovado
Arsênio	0,001	ND	0,0004	Aprovado
Bário	0,07	ND	0,0001	Aprovado
Berílio	0,0004	ND	0,00002	Aprovado
Cádmio	0,0005	ND	0,00003	Aprovado
Chumbo	0,001	ND	0,0003	Aprovado
Cobre	0,13	ND	0,0001	Aprovado
Cromo	0,005	ND	0,0003	Aprovado
Ferro	0,03	ND	0,001	Aprovado
Manganês	0,01	ND	0,0002	Aprovado
Mercurio	0,0001	ND	0,00001	Aprovado
Níquel	0,007	<0,001	0,001	Aprovado
Selênio	0,001	ND	0,0005	Aprovado
Tálio	0,0002	ND	0,0001	Aprovado
Zinco	0,5	ND	0,001	Aprovado
Fluoreto				
Fluoreto	0,12	ND	0,01	Aprovado
Parâmetro	CIPP (Bq/L)	CIPA (Bq/L)	Limite de Detecção Normalizado (Bq/L)	Avaliação
Radionuclídeos				
Radioatividade alfa global	0,01	<0,01	0,01	Aprovado
Radioatividade beta global	0,1	0,047	0,03	Aprovado

CIPA: Concentração da impureza padronizada; CIPP: Concentração de impureza permitível por produto;
 ND = Não Detectado, neste caso a concentração é menor que o limite de detecção normalizado.

4. CONCLUSÃO

Conforme NBR 15784:2017 "Produtos químicos utilizados no tratamento de água para consumo humano – Efeitos a Saúde - Requisitos", a substância teste **Greentex OPF Liq.**, foi considerada **APROVADA** para os parâmetros analisados: impurezas metálicas, fluoreto e radionuclídeos.

5. ARQUIVAMENTO

O Plano de Estudo, os Dados Brutos e o Relatório Final serão mantidos arquivados por um período mínimo de cinco anos e a substância teste por um período mínimo de 60 dias após o encerramento dos Estudos nas dependências da NSF Bioensaios - Prestação de Serviços de Análises e Certificação Ltda.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 15784 “Produtos químicos utilizados no tratamento de água para consumo humano – Efeitos a Saúde - Requisitos.” (2017).

NSF International Standard/American National Standard NSF/ANSI 60 – 2016 “Drinking Water treatment Chemicals – Health Effects”.

Viamão, 04 / 09 / 2017 .



Everton Melo dos Santos
Diretor de Estudo
Rua Palermo, 257 - Viamão - RS

RELATÓRIO DE ENSAIO

1102.2016_Pr_1_1

 Orçamento: 932-2016
 Data de Emissão: 05/09/2016

 Cliente: Greentex Especialidades Químicas
 Endereço: R. Pref. Bernardino A. de Souza, 700 - Bela Vista
 CEP: 89110-000
 Cidade: Gaspar, Santa Catarina

 CNPJ: 04.973.218/0001-83
 I.E: 254.372.708
 Fone: (47) 33972183

Dados de Identificação da Amostra

Número da Amostra: 50480 - 1102.2016_Pr_1_1

Matriz: Produtos

Local de Amostragem: Produto Químico

Data Amostragem: 29/07/2016

Ponto de Amostragem: Base de ortopolifosfatos

Hora Amostragem: Não informado

Ocorrência de chuvas no local da coleta nas últimas 24 horas: Não informado pelo cliente.

Coletor: Empresa Solicitante

Procedimento de Coleta: Responsabilidade do Cliente,

Data Recebimento: 01/08/2016

Hora Recebimento: 13:50

Resultados do Ensaio
Análises Físico-Químicas

Parâmetro	Resultado	Unidade
Alumínio *	7810	µg/L
Antimônio *	272	µg/L
Arsênio total *	34,4	µg/L
Bário Total *	208	µg/L
Berílio *	<1	µg/L
Bicarbonatos *	<2	mg/L
Cádmio total *	80	µg/L
Chumbo total *	<1	µg/L
Cloreto total *	29000	mg/L
Cobre *	268	µg/L
Cromo Total *	2400	µg/L
Fluoretos	<0,1	mg/L
Mercúrio total *	<1	µg/L
Selênio total *	<7	µg/L
Sulfato	<30	mg/L
Tálio *	<1	µg/L

Dados extras do ensaio e da qualidade

Parâmetro	LQ	U95%	Metodologia	Data de realização
Alumínio	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Antimônio	5	-	Standard Methods - 3120 - B	05/08/2016
Arsênio total	8	-	Standard Methods - 3120 - B	05/08/2016
Bário Total	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Berílio	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Bicarbonatos	2	-	Standard Methods - 2320 B	24/08/2016
Cádmio total	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Chumbo total	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Cloreto total	0,1	-	EPA 300.1:1997	08/08/2016
Cobre	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016
Cromo Total	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016

RELATÓRIO DE ENSAIO 1102.2016_Pr_1_1

Fluoretos	<0,1	-	SMEWW - 22º nd.2012, Method 4500 F-D	30/08/2016
Merúrio total	1	-	Standard Methods - 3120 - B	05/08/2016
Selênio total	7	-	Standard Methods - 3120 - B	05/08/2016
Sulfato	<30	-	Standard Methods - 4500 - SO4 - E	29/08/2016
Tálho	1	-	Standard Methods - 3120 B e 3125 B	05/08/2016

Restrições:

Este relatório somente poderá ser reproduzido na íntegra.

Os resultados das análises têm seu valor restrito às amostras analisadas no Laboratório da Umwelt.

Cadastro FATMA para Laboratório de Análises Ambientais - nº LAB/22628/CVI

Definição de termos:

*Análises terceirizadas

LQ = Limite de Quantificação



Dr. Jörg Henri Saar
Diretor Técnico



Talita L. Morais
Téc. Química Responsável
CRQ 13403488 - SC

Código Ordem Serviço: A_1102.2016

Chave de autenticação: RJR-Q3YX-2W7

Verifique a autenticidade deste documento no seguinte endereço: <http://www.umweltambiental.com.br>

Link para verificação manual: http://umwelt.glabnet3.com.br/administrativo/cadastro/valida_ordem_servico.php

Viamão, 12 de janeiro de 2017.

LAUDO ANALÍTICO BQ-153360/16 – REVISÃO 01

Empresa: Greentex Química Ltda

Endereço: Rua Geni Spinner, 45 - 89110-000 - Gaspar-SC

Identificação da amostra: Greentex OPF Liq. - Lote: 16739 - Fab: 04/10/2016 - Val: 12 meses

Amostrado por: Cliente

Data da coleta: 11/10/2016

Data de recebimento: 01/11/2016

Término das análises: 12/01/2017

METODOLOGIA

O presente relatório descreve o procedimento e apresenta o resultado do estudo de confirmação da substância ortopolifosfato de sódio na amostra Greentex OPF Liq..

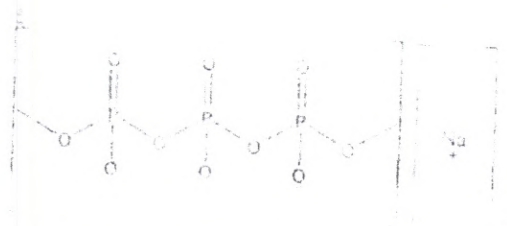


Figura 1: Estrutura química do Ortopolifosfato de sódio.

Para o processo de identificação molecular foram utilizadas duas técnicas analíticas distintas demonstradas abaixo:

Espectroscopia de infravermelho (IV)

Instrumento: FTIR – Modelo Spectrum Two, do fabricante Perkin Elmer

Acessório: ATR

Faixa de nº de onda: 550 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹

Método: Os experimentos foram utilizados com base no método PT.AT.004.

Ressonância magnética nuclear (RMN) de ³¹P

A amostra foi diluída em D₂O e analisada em um equipamento Bruker Avance DPX 250 MHz 5,87 T (Tesla).

RESULTADOS

Para análise de Espectroscopia de infravermelho (IV), No que tange à avaliação do espectro, observam-se sete bandas de absorção, dentre as quais, segundo a literatura, três podem ser associadas: - à deformação assimétrica atribuída ao grupo PO₂; - em 1251 cm⁻¹; - ao estiramento simétrico vinculado ao grupo PO₃; -, em 1075 cm⁻¹; e ao estiramento assimétrico característico da ligação P-O-P, em 869 cm⁻¹. Para as demais bandas, não foram encontradas, dentro da literatura, referências que pudessem identificá-las.

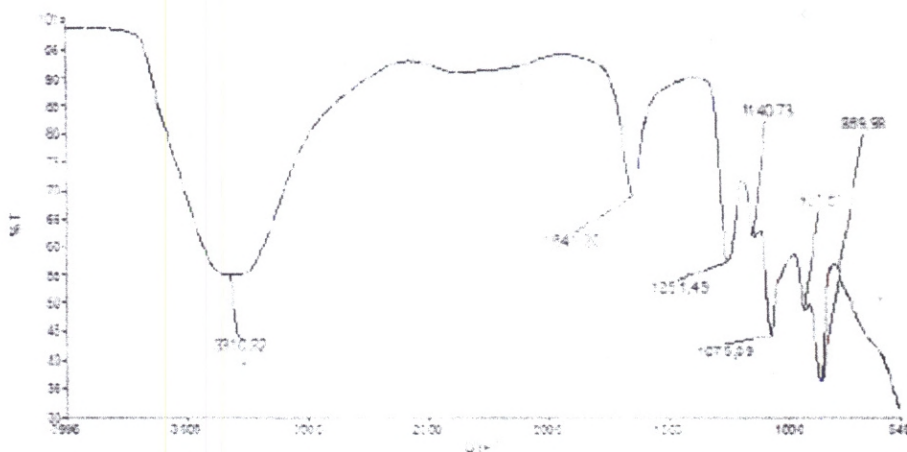


Figura 2: Espectro de infravermelho do orto-polifosfato de sódio.

As Figuras de 3 e 4 apresentam os espectros de RMN ^{31}P obtidos. Estes espectros são compostos por três sinais com distintos deslocamentos químicos, o primeiro sinal é um singlete em aproximadamente 0,5 ppm e refere-se aos núcleos de fósforo de grupos livres. O segundo sinal é um multiplete, referente aos núcleos de fósforo dos grupos fosfato de ponta de cadeia em torno de -10,0 ppm e o terceiro sinal é um multiplete da região entre -22,0 ppm que esta relacionado aos núcleos de fósforo fosfato de meio cadeia.

Figura 3: Espectro geral de RMN ^{31}P do Ortopolifosfato de sódio.



Figura 4: Espectro de RMN ^{31}P do Ortopolifosfato de sódio.

CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias aplicadas e nas condições de ensaio, a substância teste **Greentex OPF Liq**, os dados espectroscópicos de RMN ^{31}P concordam com a estrutura declarada de ortopolifosfato de sódio com cadeia maior ou igual a doze fósforos.

Everton Melo dos Santos
Químico
CRQ – 05202490 – 5ª Região

Os resultados referem-se apenas a amostra ensaiada. Este documento só pode ser reproduzido na íntegra e sem alterações. FEPAM nº 42/2011-DL.

Laudo Analítico BQ-153360/16

Cliente: Greentex Química Ltda
Endereço: Rua Geni Spinner, 45 - 89110-000 - Gaspar-SC

Proposta comercial: BOP-12296-16-1

Ident. da Amostra: Greentex OPF Liq. - Lote: 16739 - Fab: 04/10/2016 - Val: 12 meses

Amostrado por: Cliente

Data de Recebimento: 01/11/2016 10h 30min

Data da amostragem: 11/10/2016

Data elaboração do L.A.: 12/01/2017

Parâmetro	Resultado	Unidade	Método
Identificação molecular	ANEXO	--	EPA OPPTS 860.110.0
Radioatividade alfa global	<0,1	Bq/L	EPA 9310
Radioatividade beta global	<0,3	Bq/L	EPA 9310

Condições específicas de ensaios:

Nenhum desvio de método ou condições adversas foram registradas durante os ensaios.

Liberado eletronicamente por:



Everton Melo dos Santos
Químico
CRQ-05202490 5ª Região