RELATÓRIO FINAL

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA CARDIOVASCULAR: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos) SOBRE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Estudo nº: 021-FSC-035-16

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Sumário

IDENTIFICAÇÃO 4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE 5
RESUMO 6
1. OBJETIVOS DO ESTUDO 8
2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES 8
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES 8
3.1. Caracterização da Substância Teste 8
3.2 Caracterização das Substâncias de Referência 9
3.3. Caracterização do Veículo 10
3.3. Caracterização de Reagentes e Solventes 10
3.4. Preparação da Substância Teste, das Substâncias de Referência e do Veículo 11
3.5. Seleção das doses da Substância Teste e das Substâncias de Referência 12
3.6. Justificativa para a seleção das doses da Substância Teste e das Substâncias de Referência 12
4. SISTEMA TESTE 12
4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste 12
4.2. Comitê de ética 13
4.3. Alojamento dos animais no Biotério de Criação 13
4.4. Aclimatação dos animais no Biotério de Manutenção de roedores 13
4.5. Identificação dos animais 13
4.6. Condições ambientais 13
4.7. Condições de alimentação 14
4.8. Robustez, rastreabilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos dados 14
5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO 15
5.1. Desenhos Experimentais e Metodologias 15
5.1.1 Desenho Experimental - Parte I 15
5.1.2 Metodologia - Parte I 16
5.1.3 Desenho experimental - Parte II 19
5.1.4 Metodologia - Parte II 19
5.2. Grupos experimentais 21
5.2.1 Parte I 21
5.2.2 Parte II 22

5.3. Eutanásia 22
5.4. Análise de dados 22
6. RESULTADOS 23
6.1 Parte I 23
6.1.1 Efeito da Fenilefrina sobre os parâmetros hemodinâmicos 23
6.1.2 Efeito da Acetilcolina sobre os parâmetros hemodinâmicos 24
6.1.3 Efeito da Fosfoetanolamina sobre os parâmetros hemodinâmicos 27
6.2 Parte II 28
6.2.1 Efeito da Fosfoetanolamina sobre os parâmetros hemodinâmicos 28
7. CONCLUSÃO DO ESTUDO 30
8. REGISTRO DE DADOS BRUTOS 30
9. EMENDAS E DESVIOS DO ESTUDO 31
10. ARQUIVAMENTO 31
11. REFERÊNCIAS 31
12. DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO 34
13. DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO 35
ANEXO I – Certificado sanitário animal 36
ANEXO II – Certificado de qualidade da água 37

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA CARDIOVASCULAR: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOSFOETANOLAMINA (USP - São Carlos) SOBRE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS
Número do Estudo	021-FSC-035-16
Patrocinador	**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI** Telefone: +55 (61) 2033-7500 Esplanada dos Ministérios, Bloco E Brasília – DF CEP 70067-900
Instalação de Teste	**Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos** Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil CEP 88056-000
Diretor Presidente	**Dr. João Batista Calixto** Telefone: 48 32612856 E-mail: joao.calixto@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Gerente da Instalação de Teste	**Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior** Telefone: 48 32612856 E-mail: jarbas.siqueira@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Diretora de Estudo	**Dra. Edinéia Lemos de Andrade** Telefone: 48 32612856 E-mail: edineia.andrade@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Diretora de Estudo Substituto	**Dr. Allisson Freire Bento** Telefone: 48 32612856 E-mail: allisson.bento@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Unidade da Garantia da Qualidade	**Franciele Avila Silveira** Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@cienp.org.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

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

Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	19/10/16	19/10/16	19/10/16
Dados Brutos	03 e 06/03/17	06/03/17	06/03/17
Relatório Final	03 e 06/03/17	06/03/17	06/03/17

*DE: Diretor de Estudo; #GIT: Gerente da Instalação de Teste

Auditoria de estudo n° 021-FSC-035-16

Florianópolis, 06 de Março de 2017.

Franciele Avila Silveira

Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RESUMO

As avaliações da pressão arterial, frequência cardíaca e eletrocardiograma integram a bateria de testes fundamentais para a determinação da segurança cardiovascular de novas entidades químicas, preconizada pelos guias ICH S7A (2000) e ICH S7B (2005). Além disso, estudos posteriores, visando investigar o efeito de novas entidades químicas sobre a contratilidade ventricular cardíaca, são também importantes na determinação da segurança cardiovascular. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito da Substância Teste Fosfoetanolamina (USP – São Carlos) sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em animais conscientes, bem como sobre a contratilidade ventricular cardíaca em coração isolado através do método Langendorff. Para a validação do modelo experimental empregado para a determinação dos parâmetros hemodinâmicos em animais conscientes, foram testadas as Substâncias de Referência Fenilefrina e Acetilcolina, cujos efeitos sobre a hemodinâmica cardíaca são bem estabelecidos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a Fenilefrina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg (via endovenosa) causou aumento da pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão arterial diastólica (PAD). Por outro lado, a administração de Acetilcolina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg (via endovenosa) causou redução da PAM, PAS e da PAD.

A administração aguda da Substância Teste Fosfoetanolamina (USP – São Carlos), na dose de 2.500 mg/kg por via oral, não causou nenhuma alteração nos parâmetros hemodinâmicos de PAM, PAS, PAD e FC nos períodos avaliados, não apresentando, portanto, efeito hipertensivo ou hipotensivo agudo sobre o sistema cardiovascular. Além disso, o tratamento agudo dos animais com a referida Substância Teste não causou alteração da pressão média do ventrículo esquerdo (PMVE), pressão ventricular sistólica (PVS) e diastólica (PVD), frequência cardíaca (FC) e sobre as taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e negativas (-dP/dt) na pressão do ventrículo esquerdo. Portanto, a Fosfoetanolamina sintética produzida pela USP de São Carlos na dose e via testadas e nos períodos avaliados não causou alterações relevantes sobre a PAM, PAS, PAD e FC e tampouco alterou o inotropismo (força de contração), o cronotropismo (frequência de contração) e o lusitropismo (força de relaxamento) cardíacos.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Datas propostas

Data do início do estudo: 19/10/2016

Data de início do ensaio: 28/11/2016

Data de término do ensaio: 22/02/2017

Data de término do estudo: 06/03/2017

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da Fosfoetanolamina – USP (São Carlos) sobre a hemodinâmica do sistema cardiovascular em ratos através de diferentes metodologias:

- Parte I (*in vivo*) – Avaliar a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos conscientes;
- Parte II (*ex vivo*) – Avaliar a pressão intraventricular e suas derivadas através da técnica do coração isolado de rato (Langendorff).

2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES

Edinéia Lemos de Andrade, PhD	Diretora de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de PDI
Edir Rezende, BSc	Apoio Técnico

3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

3.1. Caracterização da Substância Teste

Nome	:	Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos)
Nome químico (IUPAC)	:	Não se aplica
Número do CAS	:	Não se aplica
Lote	:	Não informado
Data de fabricação	:	Não informado
Data de validade	:	Não informado
Pureza/ Composição	:	*1 Fosfoetanolamina - 32,2 %; Fosfatos inorgânicos -

		34,9%; Monoetanolamina protonada - 18,2 %; Pirofosfatos Inorgânicos – 3,6 %, Fosfobisetanolamina – 3,9 %; Água – 7,2%. *2 Fosfoetanolamina - 16,9 %; Sal (de Ca^{2+}, Zn^{2+} ou Mg^{2+}) de Fosfoetanolamina - 45,6 %; Monoetanolamina - 37,5 %.
Fabricante	:	Instituto de Química de São Carlos - USP
Aspectos físicos	:	Cristal branco
Identificação CIEnP	:	021.3

*1 *Composição na integra do composto "Fosfoetanolamina-USP" em percentagem de massa - Dados fornecidos pela Unicamp.*
*2 *Composição da fração solúvel do composto "Fosfoetanolamina-USP" em percentagem de massa - Dados fornecidos pela USP.*

3.2 Caracterização das Substâncias de Referência

Nome	: Cloridrato de L-Fenilefrina (SR1)
Nome químico (IUPAC)	: (R)-3-Hydroxy-alpha-((methylamino)methyl)benzenemethanol
Número do CAS	: 61-76-7
Lote	: SLBN9020V
Data de validade	: 10/11/2021
Pureza	: ≥ 99%
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Aspectos físicos	: Pó branco

**Dados fornecidos pelo fabricante*

Nome	: Iodeto de Acetilcolina (SR2)
Nome químico (IUPAC)	: 2-acetoxy-n,n,n-trimethylethanaminium iodide
Número do CAS	: 2050-50-6
Lote	: MKBW3657V
Data de validade	: 30/08/2018
Pureza	: ≥ 97%
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Aspectos físicos	: Pó branco

**Dados fornecidos pelo fabricante*

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

3.3. Caracterização do Veículo

Nome	:	Cloreto de sódio 0,9% (salina)
Lote	:	1601092
Data de validade	:	07/2017
Pureza	:	Não se aplica
Fabricante	:	Laboratório Tayuyna Ltda

3.3. Caracterização de Reagentes e Solventes

Nome: Isoflurano
Lote: 007727
Data de Validade: 11/2017
Fabricante: BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda

Nome: Cetamina 10%
Lote:1606951
Data de Validade: 02/2018
Fabricante: Agener União Saúde Animal

Nome: Xilasina 2%
Lote: 1621837
Data de Validade: 06/2018
Fabricante: Agener União Saúde Animal

Nome: Gliconato de clorexidina 0,5%
Lote: M23237
Data de Validade: 08/2018
Fabricante: Vic Pharma Indústria e Comércio Ltda

Nome: Álcool iodado 0,1%
Lote: M23157
Data de Validade: 08/2018
Fabricante: Vic Pharma Indústria e Comércio Ltda

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Nome: Cloridrato de lidocaína 2%
Lote: LL-037/16
Data de Validade: 01/2018
Fabricante: Hipolabor Farmacêutica

Nome: Heparina
Lote: 15129111
Data de Validade: 12/2017
Fabricante: Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

Nome: Cloridrato de tramadol
Lote: 9069062
Data de Validade: 11/2017
Fabricante: Laboratório Teuto

Nome: Benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina benzatina e sulfato de dihidroestreptocina
Lote: 002/16
Data de Validade: 08/2017
Fabricante: Virbac Saúde Animal

Nome: Solução Ringer com lactato
Lote: 0759-16
Data de Validade: 04/2018
Fabricante: JP Indústria Farmacêutica AS

3.4. Preparação da Substância Teste, das Substâncias de Referência e do Veículo

A Substância Teste foi diluída em solução de cloreto de sódio 0,9 % com auxílio de agitador (vortex) e homogeneizador de hélice. As Substâncias de Referência foram diluídas em cloreto de sódio 0,9%.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

3.5. Seleção das doses da Substância Teste e das Substâncias de Referência

Os animais receberam 2.500 mg/Kg da Substância Teste por via oral (Partes I e II do estudo). As Substâncias de Referência Fenilefrina e Acetilcolina foram testadas nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg por via endovenosa (Parte I do estudo).

O esquema Terapêutico está descrito no item 5 Procedimentos do Estudo.

3.6. Justificativa para a seleção das doses da Substância Teste e das Substâncias de Referência

A partir de dados obtidos em estudo para avaliação da atividade antitumoral da Substância Teste sobre modelo xenográfico de melanoma humano em camundongos (estudo CIEnP nº 021-TXS-003-16) foi possível observar que a dose de 500 mg/kg da Substância Teste administrada pela via oral foi eficaz em reduzir o volume tumoral (34%). A partir da conversão de doses entre as espécies, a qual leva em consideração a superfície corporal, a dose de 500 mg/kg utilizada em camundongos é equivalente a dose de 250 mg/kg para ratos (Freireich, 1966). Assim, na tentativa de observar um possível tóxico da Substância Teste sobre os parâmetros hemodinâmicos a dose de 2.500 mg/kg (10 vezes a dose que apresentou efeito terapêutico) foi testada (Lakings, 2010).

As doses escolhidas das Substâncias de Referência foram baseadas em estudos prévios da literatura (Wang et al., 1995; Dall'Ago et al. 2002; Lynch et al., 2010).

4. SISTEMA TESTE

Foram utilizados ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem "Sprague-Dawley" (Parte I) adultos pesando entre 200-400 gramas, saudáveis, provenientes do Biotério de criação do CIEnP e corações isolados da mesma espécie e linhagem (Parte II). Estes animais foram mantidos sob condições SPF "specific pathogen free", cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (EUA).

4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste

Animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem "*Sprague Dawley*", bem como o coração isolado da mesma espécie e linhagem, foram selecionados como sistema teste do presente estudo por serem internacionalmente utilizados para estudos hemodinâmicos em animais conscientes (Soltis et al., 1993; Trapani et al., 2004; Zhang et al., 2016) e em

coração isolado através da técnica de Langendorff (Anderson et al., 1990; Perić et al., 2012; Li et al., 2015; Yousefirad et al., 2016).

4.2. Comitê de ética

Os procedimentos experimentais seguiram as normas dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado, aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 251/00 e está arquivado no CIEnP.

4.3. Alojamento dos animais no Biotério de Criação

Os animais foram acondicionados no Biotério de Criação do CIEnP em caixas conectadas em racks microisoladoras adquiridos da empresa Lab Products medindo (LxCxA): 45x31x19 cm (5 animais por gaiola). Todas as gaiolas possuíam forração tipo maravalha, material para nidificação (madeira Aspen) e um pequeno bloco de madeira Aspen como enriquecimento ambiental. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo.

4.4. Aclimatação dos animais no Biotério de Manutenção de roedores

Os animais utilizados neste estudo foram acondicionados no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP, em gaiolas conectadas a racks microisoladoras da empresa ALESCO medindo (LxCxA): 48,2x33,1x21,4 cm (5 animais por gaiola), para aclimatação por um período de, no mínimo, 4 dias.

4.5. Identificação dos animais

Cada gaiola foi identificada com o nome do Diretor de Estudo, número do estudo, animal, linhagem, sexo, grupo experimental e data de início e término do estudo. Durante os experimentos, cada animal foi identificado com uma marcação na cauda, de acordo com o POP E.10/versão atual – Identificação de Animais para Estudos.

4.6. Condições ambientais

Tanto no Biotério de Criação, quanto no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP, as gaiolas foram limpas e desinfetadas semanalmente. A temperatura da sala foi

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ajustada para 21 ± 3 °C com faixa de umidade de 39,9 – 65,9 %. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h, sendo que o ciclo claro iniciou às 6:30 da manhã. A sala de manutenção de roedores possui as mesmas condições de temperatura e umidade do biotério do CIEnP.

4.7. Condições de alimentação

Os animais receberam água e ração *ad libitum* por todo o período do estudo, sendo a ração da marca Nuvital CR1® (Quimtia, Colombo, Paraná, Brasil) autoclavada, e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina *Hydropac* (*Lab Products*, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais.

4.8. Robustez, rastreabilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos dados

Visando reduzir ao máximo desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados critérios propostos pelo ARRIVE (do inglês, *Animal Research Reporting In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010) e adotados pelos periódicos *British Journal of Pharmacology* (McGrath e Liley, 2015) e *Biochemical Pharmacology* (Mullane et al., 2015). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi omitido para efeito de cálculo das médias e análise estatística; 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais; 3) Todos os reagentes foram obtidos de fornecedores credenciados pelo CIEnP e somente foram usados dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante; 4) Todos dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados pelo pessoal responsável pela condução do estudo e foram auditados pela UGQ; 5) O número de animais em cada grupo experimental foi o recomendado pela literatura (Lakings, 2010);

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

5.1. Desenhos Experimentais e Metodologias

5.1.1 Desenho Experimental - Parte I

Para a realização do protocolo experimental de avaliação *in vivo* dos parâmetros hemodinâmicos, no dia -1, foi realizado o procedimento cirúrgico de cateterização da artéria carótida para captação da pressão arterial e frequência cardíaca e da veia jugular para administração das Substâncias de Referência. No dia 0, os animais foram colocados na sala de teste para ambientação e o cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão e ao sistema de captação de dados (ver Metodologia – Parte I).

No presente estudo, a avaliação do efeito das Substâncias de Referência Fenilefrina e Acetilcolina foi realizada com o objetivo de verificar a responsividade do sistema cardiovascular adrenérgico/colinérgico após a realização da cirurgia, bem como para verificar se a Substância Teste poderia interferir com o mesmo. Desta forma, os animais foram tratados com Fenilefrina ou Acetilcolina (12,5 nmol/kg e 75 nmol/kg, via endovenosa), antes e após a administração da Substância Teste. Assim, após a finalização do registro dos efeitos da Substância de Referência Fenilefrina ou Acetilcolina (12,5 e 75 nmol/kg, via endovenosa), os cateteres arterial e venoso foram desconectados e os animais foram tratados pela via oral com a Substância Teste na dose de 2.500 mg/kg. A seguir, o cateter arterial foi reconectado para permitir a captação dos parâmetros hemodinâmicos.

Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 24 horas após a administração da Substância Teste, como mostrado na Figura 1. A escolha dos períodos de avaliação foi proposta de acordo com o perfil farmacocinético da Substância Teste descrito em estudo prévio (Estudo CIEnP nº 021-PKB-023-15). Após a finalização do registro do período de 24 horas do tratamento, os animais receberam a Substância de Referência Fenilefrina ou Acetilcolina (12,5 e 75 nmol/kg, via endovenosa).

Os tratamentos com as Substâncias de Referência seguiram protocolos distintos, de acordo com a ordem dos tratamentos: 1) animais que receberam Acetilcolina e a Substância Teste no dia 0 e Fenilefrina no dia 1; 2) animais que receberam Fenilefrina e Substância Teste no dia 0 e Acetilcolina no dia 1. Para não causar interferência na volemia, o volume máximo das Substâncias de Referência administrado aos animais pela via endovenosa foi de 900 µL.

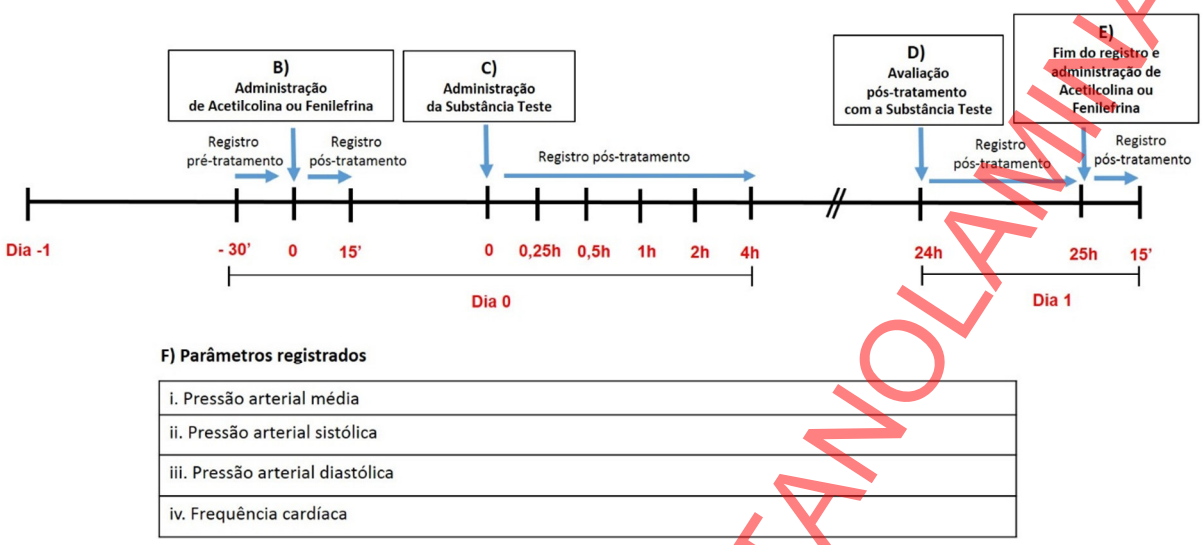


Figura 1: Desenho experimental para avaliação do potencial efeito tóxico agudo da Substância Teste sobre parâmetros hemodinâmicos. (A) Pré-teste (dia -1): cirurgia de cateterização da artéria carótida para captação da pressão arterial e frequência cardíaca e da veia jugular para administração das Substâncias de Referência. (B) Teste (dia 0): no tempo 0, os animais receberam Acetilcolina ou Fenilefrina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa (0,5 mL/kg). Cada animal foi avaliado por aproximadamente 15 minutos após as administrações. (C) Após os valores retornarem ao nível basal, os animais foram tratados com a Substância Teste na dose de 2.500 mg/kg, pela via oral (5 ml/Kg). Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 24 horas após a administração. (D) Teste (dia 1): avaliação do período de 24 horas após o tratamento com a Substância Teste e (E) tratamento com Acetilcolina ou Fenilefrina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa (0,5 mL/kg). Cada animal foi avaliado por aproximadamente 15 minutos após as administrações da Substância de Referência. F) Parâmetros hemodinâmicos registrados: pressão arterial média, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca.

5.1.2 Metodologia - Parte I

O procedimento para aferição da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos conscientes se dividiu em duas etapas. A primeira etapa consistiu em realizar uma intervenção cirúrgica para obtenção dos dois acessos vasculares, sendo um acesso arterial (artéria carótida) para averiguação da PA e FC e um acesso venoso (veia jugular) para a administração endovenosa das Substâncias de Referência. A segunda etapa consistiu da avaliação da PA e FC.

Intervenção cirúrgica

Os animais foram anestesiados com a associação de Cetamina 42 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.). A manutenção da anestesia durante o procedimento cirúrgico foi feita com isoflurano de 0,5 a 2 % + 4L/min de oxigênio sob fluxo constante. Os

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

animais anestesiados foram colocados sobre um colchão térmico previamente aquecido a uma temperatura de ± 37 °C. A seguir, foi feita tricotomia tanto da região cervical ventral (para a canulação dos vasos sanguíneos) quanto da região cervical dorsal (para externalização dos cateteres vasculares) do animal. Após a tricotomia, foi realizada a assepsia das regiões com clorexidina alcoólica 0,5% e administração de 400 µL de solução de lidocaína 2% (sem vasoconstritor) pela via subcutânea. Após alguns minutos, foi feita a assepsia do local com álcool iodado 0,1%.

O procedimento de cateterização da veia jugular direita e da artéria carótida esquerda foram realizadas em momentos distintos, iniciando-se pela veia jugular. A cateterização consistiu da divulsão dos tecidos adjacentes até a localização do vaso. Ao visualizá-lo, o mesmo foi isolado com uma pinça e seccionado na região medial, sem ser rompido, e uma cânula (Abocath 20) previamente preenchida com uma solução de heparina a 50 UI/mL foi introduzida. Esta solução serviu para evitar a obstrução do fluxo do cateter com coágulos. A extremidade distal (caudal) do cateter foi fixada com ajuda de fio de sutura (fio de Nylon 4-0) e a outra extremidade foi externalizada para a região cervical dorsal do animal, realizando para isto um "túnel" subcutâneo com ajuda de um Abocath 14. A extremidade externalizada do cateter foi obstruída com um acessório especial para evitar refluxo de sangue.

Cuidados pós-cirúrgicos

Ao término do procedimento de cateterização dos vasos, a anestesia foi interrompida e o animal foi colocado em decúbito lateral na caixa de habitação. Foi iniciado o protocolo de cuidados pós-cirúrgicos que consistiu da administração de Tramadol (10 mg/kg, via intraperitoneal, 12 em 12 horas). Além disso, foi realizada antibioticoterapia com benzilpenicilina procaína+benzilpenicilina benzatina+sulfato de diidroestreptomicina (30.000 U/kg, dose única, pela via intramuscular) e fluidoterapia com 8 mL de solução Ringer com lactato. O fluxo dos cateteres foi verificado com a solução de bloqueio.

O experimento para a avaliação da PA e da FC foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico. Foram avaliados os seguintes parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos

No dia da avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, a extremidade do cateter arterial foi conectada a um transdutor de pressão para registro da pressão PAM, PAS e PAD analisadas em unidades de mmHg e a FC analisada em unidades de batimentos por minuto (bpm). O transdutor de pressão foi conectado ao equipamento de aquisição de dados PowerLab 8/32 para que o software LabChart juntamente com o módulo de análise FE228 Octal Bridge Amp possa converter os registros em dados brutos. Um período de aproximadamente 30 minutos de estabilização foi obedecido antes do início da administração de substâncias.

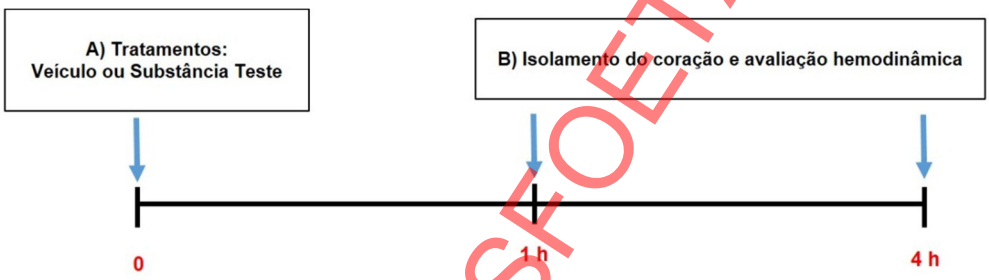
Para avaliar o efeito da Substância Teste e das Substâncias de Referência sobre a PAM, PAS, PAD e FC, foram tomados os valores dos parâmetros hemodinâmicos antes e após a administração destas. As Substâncias de Referência foram administradas pela via endovenosa. Para a administração da Substância Teste pela via oral foi necessário interromper o registro dos dados, desconectar o cateter arterial do transdutor de pressão e ocluí-lo e, em seguida, realizar a administração da Substância Teste através de gavagem com cânula específica e retorno do animal à caixa de habitação, reconexão do cateter arterial e reinício do registro.

O tempo de registro dos parâmetros hemodinâmicos após a administração das Substâncias de Referência citadas foi o suficiente para verificar o efeito agudo hipertensivo da Fenilefrina ou hipotensivo da Acetilcolina (aproximadamente 15 minutos, com período de estabilização entre as doses da Substância de Referência). Após o retorno aos valores basais, a Substância Teste foi administrada. Os tempos de registro dos parâmetros hemodinâmicos após a administração da Substância Teste foram determinados de acordo com o perfil farmacocinético da Substância Teste. Assim, o registro foi feito em 2 etapas, sendo na primeira etapa o registro feito continuamente por 4 horas e na segunda etapa o registro feito por 1 hora, no período de 24 após a administração da Substância Teste. Após a finalização da etapa 1 (dia 0), o cateter arterial foi desconectado do transdutor de pressão e do sistema de captação de dados. Os animais foram mantidos na caixa de habitação até a realização da etapa 2. No dia 1 (etapa 2), o cateter arterial foi reconectado ao transdutor de pressão e ao sistema de captação de dados. Ao final deste período, os animais foram eutanasiados pela via endovenosa com a mistura de cetamina (42 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

5.1.3 Desenho experimental - Parte II

Para a realização do protocolo experimental de avaliação *ex vivo* dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram tratados com Veículo (salina) ou com a Substância Teste Fosfoetanolamina e decorridas 1 ou 4 horas do tratamento, o animal foi eutanasiado e o coração isolado. O coração foi fixado no aparelho de perfusão de Langendorff e um balão de látex, previamente conectado ao transdutor de pressão e ao sistema de captação de dados, foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo para o registro de parâmetros hemodinâmicos (ver Metodologia – Parte II).



C) Parâmetros registrados

i. Pressão média do ventrículo esquerdo (PMVE)
ii. Pressão diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE; PDVE)
iii. Taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e negativas (-dP/dt)
iv. Frequência cardíaca (FC)

Figura 2: Desenho experimental para avaliação do potencial efeito tóxico agudo da Substância Teste sobre parâmetros hemodinâmicos através da técnica de coração isolado. Os animais receberam Veículo (salina, 5 mL/kg, v.o.) ou a Substância Teste Fosfoetanolamina na dose de 2.500 mg/kg (5 mL/kg, v.o.) (A) e os corações foram isolados 1 e 4 horas após o tratamento para a avaliação hemodinâmica (B). Os parâmetros hemodinâmicos registrados durante 30 minutos foram: pressão do ventrículo esquerdo (PVE), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE), taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e negativas (-dP/dt) na pressão do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca (FC) (C).

5.1.4 Metodologia - Parte II

A função cardíaca dos animais foi avaliada através da técnica de órgão isolado e perfundido (Langendorff), de acordo com estudo prévio (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Para tal, animais receberam a administração intraperitoneal (i.p) de heparina (200 UI) e 10 a 15 minutos após, foram anestesiados com uma mistura de cetamina 42 mg/kg e xilasina 8

mg/kg, via intraperitoneal. Após os animais atingirem um quadro de ansiólise, foram eutanasiados e o coração isolado.

O coração foi colocado em um recipiente contendo solução de Krebs-Hanseleit (composição: 10 mM D-glucose; 1,6 mM $MgSO_4$; 1,2 mM $KHPO_4$; 4,7 mM KCl; 118 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$; 2,5 mM $CaCl_2$, pH 7,4) a ± 4º C, sob oxigenação. Os tecidos adjacentes foram removidos de maneira que somente o coração pudesse ser visualizado, a aorta foi seccionada antes do arco aórtico e acoplada à uma cânula de aço inoxidável, sem ultrapassar a valva aórtica. A cânula (já com o coração nela fixado) foi conectada ao sistema de perfusão, através do qual o coração recebeu fluxo constante de 8 mL/min de solução de Krebs-Henseleit, previamente aquecido a uma temperatura de ± 37 °C e aerado com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2). Um balão de látex preenchido com água foi inserido no lúmen do ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo. A porção final do cateter fixado ao balão foi conectado a um transdutor de pressão. O balão foi inflado até atingir uma pressão diastólica constante de 5-10 mmHg e os corações foram estabilizados por aproximadamente 20 minutos. Após este período, os registros dos parâmetros hemodinâmicos foram realizados durante 30 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: pressão do ventrículo esquerdo (PVE), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica do ventrículo esquerda (PDVE), taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e negativas (-dp/dt) na pressão do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca (FC).

Todos os sinais foram capturados pelo transdutor de pressão conectado a um amplificador de sinal (Octal Bridge Amp modelo FE228, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram registrados por um sistema de aquisição de dados (Powerlab 8/35, ADInstruments).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

5.2. Grupos experimentais

5.2.1 Parte I

Os animais foram separados em 2 diferentes grupos determinados aleatoriamente.

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, periodicidade, dose, via de administração, volume de administração e número de animais por grupo experimental.

Grupos experimentais	**Grupo 1**	**Grupo 2**
Tratamento	SR1+Fosfoetanolamina+SR2	SR2+Fosfoetanolamina+SR1
Periodicidade	1 única vez cada tratamento	1 única vez cada tratamento
Dose	SR 1 - 12,5 e 75 nmol/kg Fosfoetanolamina 2.500 mg/kg SR2 - 12,5 e 75 nmol/kg	SR2 - 12,5 e 75 nmol/kg Fosfoetanolamina 2.500 mg/kg SR1 - 12,5 e 75 nmol/kg
Via de Administração	Endovenosa (SR 1 e 2); Oral (Fosfoetanolamina)	Endovenosa (SR 1 e 2) Oral (Fosfoetanolamina)
Volume de Administração	0,5 mL/kg (SR 1 e 2) 5 mL/kg (Fosfoetanolamina)	0,5 mL/kg (SR 1 e 2) 5 mL/kg (Fosfoetanolamina)
Animal por Grupo	6	6

SR1: Substância de Referência 1 - Fenilefrina

SR2: Substância de Referência 2 – Acetilcolina

5.2.2 Parte II

Os animais foram separados em 2 diferentes grupos determinados aleatoriamente.

Tabela 2. Representação dos grupos experimentais, tratamento, periodicidade, dose, via de administração, volume de administração e número de animais por grupo experimental.

Grupos experimentais	**Grupo 1**	**Grupo 2**
Tratamento	Veículo (salina)	Fosfoetanolamina
Periodicidade	1 vez	1 vez
Dose	----	2.500 mg/kg
Via de Administração	Oral	Oral
Volume de Administração	5 mL/kg	5 mL/kg
Animal por Grupo	5	5

5.3. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados pela via endovenosa com a mistura de cetamina (42 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) (Parte I) e por decapitação (Parte II) conforme POP E.11/versão atual e Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais.

5.4. Análise de dados

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados relativos à variação entre os valores obtidos antes (basal) e após a administração da Fenilefrina ou Acetilcolina foram representados como valores de delta (Δ). Foi utilizado o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises dos dados.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

6. RESULTADOS

6.1 Parte I

6.1.1 Efeito da Fenilefrina sobre os parâmetros hemodinâmicos

Como pode ser observado na Figura 3, os animais que receberam a Fenilefrina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa, apresentaram aumento na PAM, PAS e PAD caracterizando o efeito hipertensivo agudo causado pela Fenilefrina (Figura 3A-C). Além disso, foi observado diminuição da FC caracterizando o efeito de bradicardia reflexa em resposta ao aumento da PAM, um mecanismo de controle autonômico através de barorreceptores (Figura 3D). Os dados foram representados como a variação entre os valores obtidos antes (basal) e após a administração da Fenilefrina (Δ – delta). Os valores obtidos foram: ΔPAM 21,1 ± 5,2 e 34,0 ± 3,6; ΔPAS: 30,4 ± 5,2 e 53,4 ± 3,9; ΔPAD: 14,9 ± 7,5 e 12,0 ± 5,1 (em mmHg) e ΔFC: -63,5 ± 62,4 e -85,3 ± 60,6 bpm para as doses de 12,5 e 75 nmol/kg, respectivamente. Esses resultados corroboram com os dados da literatura (Dall'Ago et al. 2002; Lynch et al., 2010) e demostram que o sistema é capaz de capturar variações nos parâmetros hemodinâmicos em resposta à Substância de Referência.

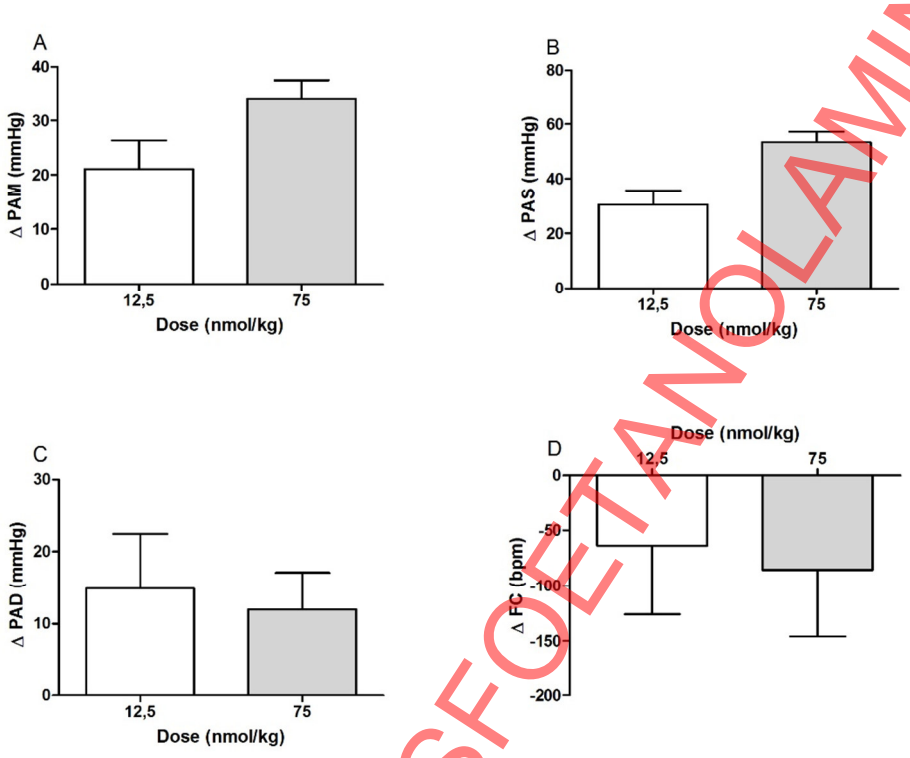


Figura 3. Efeito da Fenilefrina sobre parâmetros hemodinâmicos em ratos conscientes. Os animais foram tratados com Fenilefrina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa (0,5 mL/kg). Os parâmetros hemodinâmicos registrados foram: (A) pressão arterial média (PAM), (B) pressão arterial sistólica (PAS), (C) pressão arterial diastólica (PAD) (em mmHg) e (D) frequência cardíaca (FC) (em bpm). Os resultados são representados pela variação entre os valores obtidos antes (basal) e após a administração da Fenilefrina (Δ - delta). Cada coluna representa a media ± erro padrão da média de 6 animais.

6.1.2 Efeito da Acetilcolina sobre os parâmetros hemodinâmicos

A administração de Acetilcolina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa, causou redução na PAM, PAS e PAD, mostrando um efeito hipotensivo agudo causado pela Acetilcolina (Figura 4A-C). No entanto, não foi observado o efeito de taquicardia reflexa em resposta à redução da PAM, pois houve redução na FC em resposta à Acetilcolina (Figura 4D). Esse resultado pode ser explicado pelo fato que a Acetilcolina exerce efeitos mínimos sobre artérias coronarianas (Coyne, 2006), portanto não sendo capaz de induzir taquicardia reflexa. Os dados foram representados como a variação entre os valores obtidos antes (basal) e após a administração da Acetilcolina (Δ – delta). Os

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

valores obtidos foram: ΔPAM -29,6 ± 5,0 e -38,8 ± 9,5; ΔPAS: -7,3 ± 3,6 e -10,7 ± 2,3; ΔPAD: -46,5 ± 7,3 e -51,3 ± 11,0 (em mmHg) e ΔFC: -37,3 ± 59,7 e -357,0 ± 315,8 bpm para as doses de 12,5 e 75 nmol/kg, respectivamente. Tais dados estão de acordo com a literatura (Yu e McNeill, 1992; Wang et al., 1995) e demostram que o sistema é capaz de capturar variações nos parâmetros hemodinâmicos em resposta à Substância de Referência.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

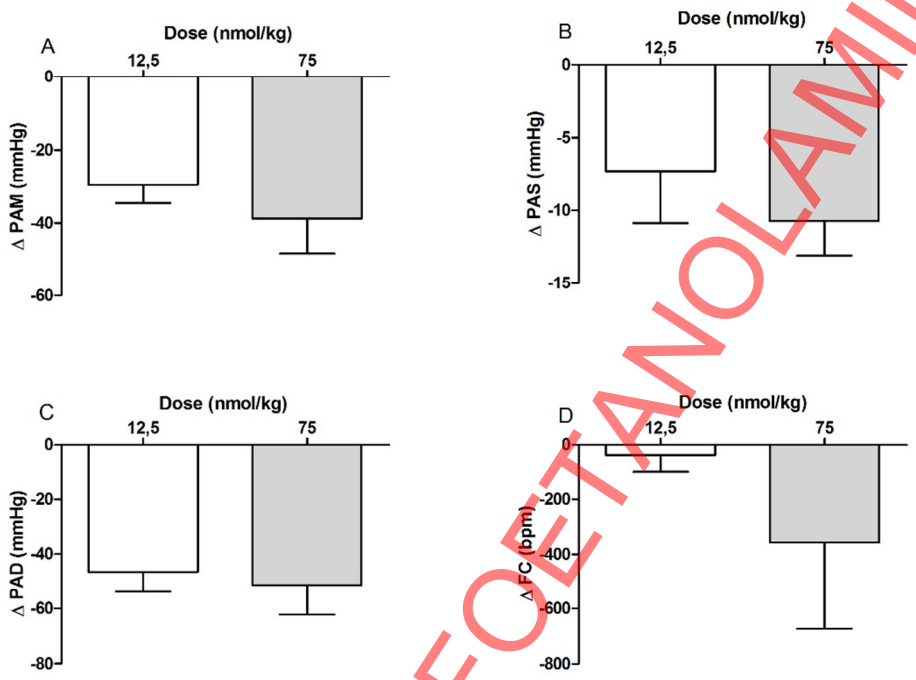


Figura 4. Efeito da Acetilcolina sobre parâmetros hemodinâmicos em ratos conscientes. Os animais foram tratados com Acetilcolina nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg, pela via endovenosa (0,5 mL/kg). Os parâmetros hemodinâmicos registrados foram: (A) pressão arterial média (PAM), (B) pressão arterial sistólica (PAS), (C) pressão arterial diastólica (PAD) (em mmHg) e (D) frequência cardíaca (FC) (em bpm). Os resultados são representados pela variação entre os valores obtidos antes (basal) e após a administração da Acetilcolina (Δ - delta). Cada coluna representa a media ± erro padrão da média de 6 animais.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

6.1.3 Efeito da Fosfoetanolamina sobre os parâmetros hemodinâmicos

Os resultados obtidos demonstraram que a administração aguda de Fosfoetanolamina, na dose de 2.500 mg/kg pela via oral, não causou nenhuma alteração significativa nos parâmetros hemodinâmicos de PAM, PAS, PAD e FC em comparação aos valores basais (pré-tratamento) (Figura 5).

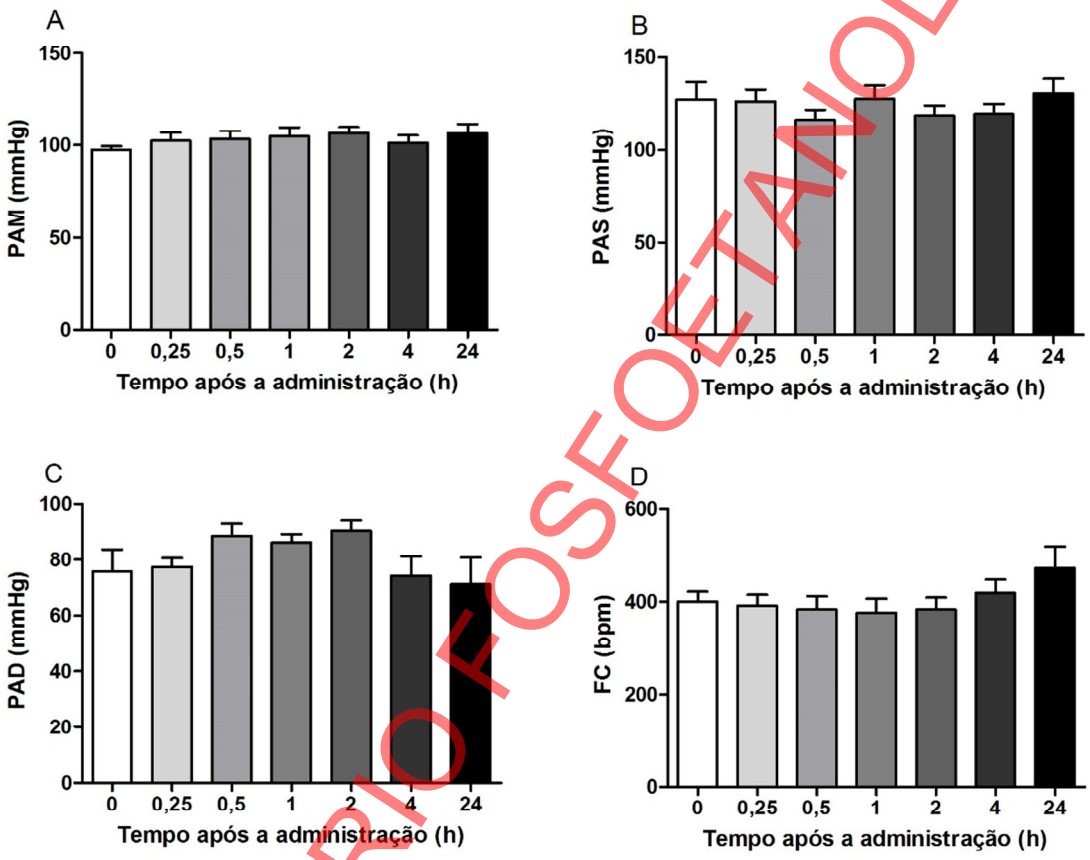


Figura 5. Efeito da Fosfoetanolamina (USP – São Carlos) 2.500 mg/kg administrada pela via oral sobre parâmetros hemodinâmicos em ratos conscientes. Os animais foram tratados com Fosfoetanolamina na dose de 2.500 mg/kg, pela via oral (5 mL/kg) e avaliados nos períodos de 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 24 horas após a administração em comparação aos valores basais (pré-tratamento, tempo 0). Os parâmetros hemodinâmicos registrados foram: (A) pressão arterial média (PAM), (B) pressão arterial sistólica (PAS), (C) pressão arterial diastólica (PAD) (em mmHg) e (D) frequência cardíaca (FC) (em bpm). Cada coluna representa a media ± erro padrão da média de 6 animais.

6.2 Parte II

6.2.1 Efeito da Fosfoetanolamina sobre os parâmetros hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos de pressão média do ventrículo esquerdo (PMVE), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE) representam índices da contratilidade/relaxamento ventriculares cardíacos. Outro importante parâmetro hemodinâmico avaliado foi a frequência cardíaca (FC), que está relacionada à atividade cronotrópica cardíaca. Neste contexto, os corações isolados de animais que receberam o tratamento com a Substância Teste Fosfoetanolamina (2.500 mg/kg, v.o.) não apresentaram qualquer alteração nos parâmetros hemodinâmicos de PMVE, PSVE, PDVE e FC (Figura 6) em comparação aos corações isolados de animais que receberam o tratamento com Veículo (salina).

As taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e negativas (-dP/dt) são derivadas temporais da pressão do ventrículo esquerdo, sendo utilizadas como índices para a avaliação da função ventricular. A derivada +dP/dt é considerada um índice de contratilidade, tornando possível avaliar indiretamente o inotropismo cardíaco (força de contração muscular). Por outro lado, a derivada -dP/dt é considerada um índice de relaxamento, que possibilita avaliar indiretamente a capacidade de relaxamento do coração e que diz respeito à outra propriedade do coração, o lusitropismo. Como pode ser observado na Figura 7, o tratamento com a Substância Teste Fosfoetanolamina (2.500 mg/kg, v.o.) quando analisado 1 e 4h após o tratamento, não causou qualquer alteração nas derivadas temporais ventriculares +dP/dt e -dP/dt em comparação ao tratamento com Veículo (salina).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

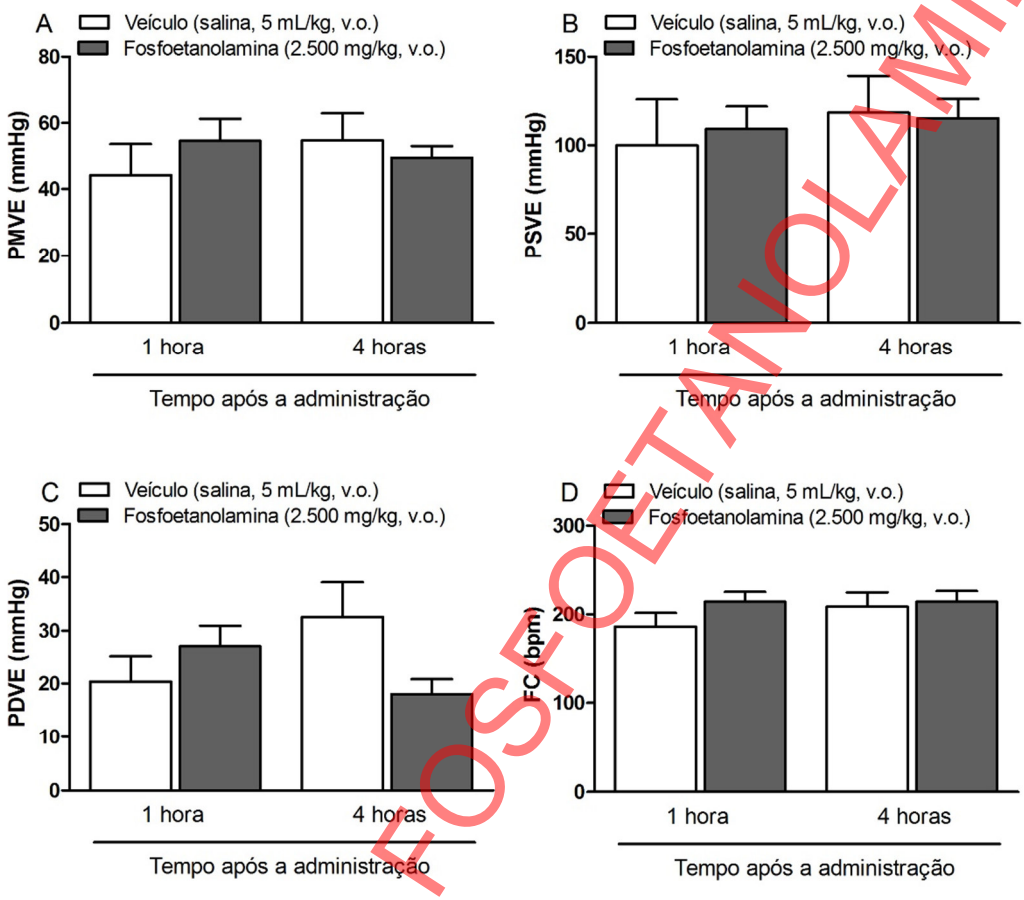


Figura 6. Efeito da Fosfoetanolamina (USP – São Carlos) 2.500 mg/kg administrada pela via oral sobre parâmetros hemodinâmicos em coração isolado de rato. Os animais foram tratados com Veículo (salina, 5 mL/kg) ou Fosfoetanolamina na dose de 2.500 mg/kg (5 mL/kg), ambos pela via oral, e os corações isolados nos períodos de 1 ou 4 horas após a administração. Os parâmetros hemodinâmicos registrados foram: (A) pressão média do ventrículo esquerdo (PMVE), (B) pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), (C) pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE) (em mmHg) e (D) frequência cardíaca (FC) (em bpm). Cada coluna representa a media ± erro padrão da média de 6 corações.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

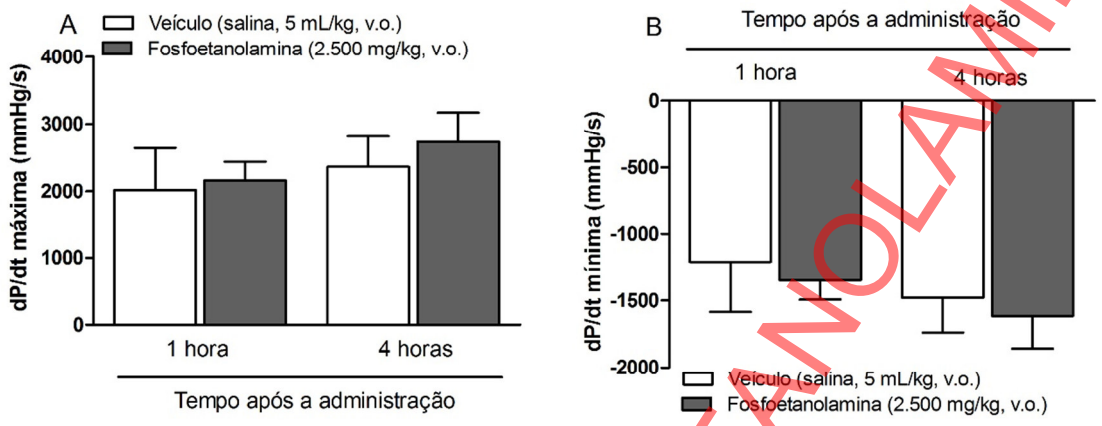


Figura 7. Avaliação do efeito da Fosfoetanolamina (USP – São Carlos) sobre parâmetros hemodinâmicos em coração isolado de rato. Os animais foram tratados com Veículo (salina, 5 mL/kg) ou Fosfoetanolamina na dose de 2.500 mg/kg (5 mL/kg), ambos pela via oral, e os corações isolados nos períodos de 1 ou 4 horas após a administração. Os parâmetros hemodinâmicos registrados foram: (A) taxas de pico de alterações positivas (+dP/dt) e (B) negativas (-dP/dt) na pressão do ventrículo esquerdo (em mmHg/s). Cada coluna representa a media ± erro padrão da média de 6 corações.

7. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados descritos neste relatório demostram que as Substâncias de Referência Fenilefrina e Acetilcolina, testadas nas doses de 12,5 e 75 nmol/kg por via endovenosa, induziram hipertensão e hipotensão agudas, respectivamente. Contudo, a Substância Teste Fosfoetanolamina (USP – São Carlos), testada na dose de 2.500 mg/kg pela via oral, não induziu nenhuma alteração importante sobre os parâmetros hemodinâmicos. Portanto, a referida Substância Teste na dose e via testadas e nos períodos avaliados não exerceu efeitos hipertensivos ou hipotensivos agudos e tampouco causou alterações sobre o cronotropismo (frequência de contração), inotropismo (força de contração) e lusitropismo (força de relaxamento) cardíacos.

8. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados prontamente em formulário adequado.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

9. EMENDAS E DESVIOS DO ESTUDO

Emendas e desvios ao plano de estudo, quando necessários, foram justificados, aprovados, datados e mantidos junto ao Plano de Estudo.

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final será arquivada por, no mínimo, 5 anos no CIEnP. A Substância Teste será armazenada no CIEnP até a expiração de sua validade.

11. REFERÊNCIAS

Anderson PG, Digerness SB, Sklar JL, Boor PJ. Use of the isolated perfused heart for evaluation of cardiac toxicity. Toxicol Pathol. 18(4 Pt 1):497-510, 1990.

Coyne CP. Comparative Diagnostic Pharmacology: Clinical and Research Applications in Living-System Models, 1st edition. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

Dall'Ago P, Silva VO, De Angelis KL, Irigoyen MC, Fazan R Jr, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. Braz J Med Biol Res. 35(7): 843-849, 2002.

Freireich, EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man. Cancer Chemother Rep. 50(4):219-244, 1966.

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. Conselho Federal de medicina Veterinária (CFMV), Brasília, 2013.

ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2000.

ICH S7B: The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals, 2005.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. PLoS Biol. 8(6): e1000412, 2010.

Lakings DB. Nonclinical Saphety Pharmacology Studies Recommended for Support of First-in-Human Trials Clinical Trials. In: Mitchell NC, editor. Early Drug Development: Strategies and Routes to First-in-Human Trials. John Wiley and Sons, Inc., 249-280, 2010.

Li Y, Abu-Asab M, Su J, Qiu P, Feng J, Ohanjanian L, Kumar HS, Fitz Y, Eichacker PQ, Cui X. Bacillus anthracis edema but not lethal toxin challenge in rats is associated with depressed myocardial function in hearts isolated and tested in a Langendorff system. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 308(12):H1592-1602, 2015.

Lynch JJ Jr, Detwiler TJ, Kane SA, Regan CP. Effect of calcitonin gene-related peptide receptor antagonism on the systemic blood pressure responses to mechanistically diverse vasomodulators in conscious rats. J Cardiovasc Pharmacol. 56(5): 518-525, 2010.

McGrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. Br J Pharmacol. 172(13): 3189-3193, 2015.

Mullane K, Enna SJ, Piette J, Williams M. Guidelines for manuscript submission in the peer-reviewed pharmacological literature. Biochemical Pharmacology, 97: 225-235, 2015.

Perić T, Jakovljević VLj, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrović ZD, Simijonović D, Novokmet S, Djuric DM, Janković SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. Med Chem. 8(1):9-13, 2012.

Soltis EE, Jewell AL, Dwoskin LP, Cassis LA. Acute and chronic effects of losartan (DuP 753) on blood pressure and vascular reactivity in normotensive rats. Clin Exp Hypertens. 15(1):171-84, 1993.

Trapani AJ, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Firooznia F, Jeng AY. CGS 35601 and its orally active prodrug CGS 37808 as triple inhibitors of endothelin-converting enzyme-1, neutral endopeptidase 24.11, and angiotensin-converting enzyme. J Cardiovasc Pharmacol. 44 Suppl 1: S211-215, 2004.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Wang YX, Cheng X, Pang CC. Vascular pharmacology of methylene blue in vitro and in vivo: a comparison with NG-nitro-L-arginine and diphenyleneiodonium. Br J Pharmacol. 114(1): 194-202, 1995.

Yu Z, McNeill JH. Blood pressure and heart rate response to vasoactive agents in conscious diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol 70(12):1542-1548, 1992.

Yousefirad N, Kaygısız Z, Aydın Y. Amyloid beta peptide 22-35 induces a negative inotropic effect on isolated rat hearts. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 25;8(4):146-151, 2016.

Zhang P, Kong D, Du Q, Zhao J, Li Q, Zhang J, Li T, Ren L. A conscious rat model involving bradycardia and hypotension after oral administration: a toxicokinetical study of aconitine. Xenobiotica. 14:1-11, 2016.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

12. DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se a Substância Teste utilizada.

Dra. Edinéia Lemos de Andrade
Diretor do Estudo

06/03/2017
Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

13. DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.

Allisson Freire Bento — 06/03/2017

Dr. Allisson Freire Bento
Diretor de Estudo Substituto

Data

06/03/2017

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

Data

João Calixto — 6/3/17

Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIEnP

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ANEXO I – Certificado sanitário animal

CERTIFICADO SANITÁRIO

Os animais criados no CIEnP são classificados sanitariamente como **SPF** (Specific Pathogen Free), conforme Relatório Técnico emitido pela **Neoprospecta Microbiome Technologies** (Junho/2016) e não apresentam os seguintes patógenos:

VÍRUS	BACTÉRIAS/FUNGOS	PARASITAS
Vírus Sendai	*Bortedella bronchiseptica*	*Giardia sp*
Vírus da Pneumonia Murina	*Cilia-Associated Respiratory Bacillus*	*Spironucleus sp*
Vírus da Hepatite Murina	*Citrobacter rodentium*	*Tritrichomonas muris*
ParvoVírus de camundongo Mouse parvovirus-1 - MPV e Minute Virus of Mice - MVM	*Corynebacterium kutscheri*	*Tritrichomonas minuta*
Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler	*Helicobacter bilis*	*Entamoeba muris*
Reovírus murino tipos 1, 2 e 3	*Helicobacter hepaticus*	*Chlimostix beltencourti*
Vírus da Diarréia Epizoótica de camundongos recém-nascidos	*Helicobacter sp.*	*Myobia musculi*
AdenoVírus de camundongo	*Klebsiella oxycota*	*Myocoptes musculinus*
PoliomaVírus K	*Klebsiella pneumoniae*	*Radfordia affinis*
CitomegaloVírus de camundongo	*Mycoplasma pulmonis*	*Polyplax serrata*
Vírus do timo do camundongo ou Murid herpesvirus 3	*Pasteurella multocida*	*Radfordia ensifera*
Vírus da Coriomeningite Linfocítica	*Pasteurella pneumotropica*	*Eimeria sp*
HantaVírus	*Pseudomonas aeroginosa*	*Cryptosporidium sp*
Vírus ectromelia	*Salmonella moniliformis*	*Syphacia muris*
Vírus da elevação da lactato dehidrogenase	*Salmonella sp*	
NoroVírus Murino	*Staphylococcus aureus*	
Vírus Sialodacryoadenitis	*Staphylococcus sp*	
Parvovírus (RV, H-1, RMV, RPV-1A)	*Streptococcus beta hemolítico (Streptococcus pyogenes)*	
Theliovírus	*Streptococcus moniliformis*	
Vírus da Diarreia Viral	*Streptococcus pneumoniae*	
Vírus Respiratório Sincicial	*Tizzer (Clostridium piliformes)*	
Vírus Parainfluenza 3	*Pneumocystis murina*	
Adenovírus	*Pneumocystis wakefieldiae*	
Herpesvírus 1	*Trichophyton sp*	
Herpesvírus 1 e 5	*Encephalitozoon cuniculi*	
Vaccinia vírus (Poxvírus)		

Responsável Técnica –
Médica Veterinária
CRMV SC 05851

ANEXO II – Certificado de qualidade da água

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_695.2016_AP_1_1

São José, 29 de novembro de 2016

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Cienp Centro de Inovação e Ensaios Pré Clínicos
Endereço: Av. Luiz Bouteix Piazza, 1302
Cidade: Florianópolis , Santa Catarina
CEP: 88.056-000
Fone: (48) 3261-2856

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 695.2016_AP_1_1
Procedência: Água Potável
Ponto Coleta: Água Potável - Água para os animais do biotério
Temperatura Amostra no receb.: 8,0 ºC
Data Recebimento: 24/11/2016 17:30
Responsável pela Coleta: Cliente
Data/Hora Coleta: 17/11/2016

Condições Climáticas: Ensolarado
1ª Legislação: Portaria MS 2914 de 12/12/2011 (Federal)

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
Alumínio Total	≤ 0,2 mg/L	0,11	mg Al/L
Cloretos	≤ 250 mg/L	19,06	mg Cl-/L
Cloro Residual Livre	entre 0,2 e 5,0 mg/L	0,37	mg/L
Condutividade	-	143,50	µS/cm
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Contagem de Coliformes Totais	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Cor Aparente	≤ 15 Pt/Co	1,00	Pt/Co
Dureza Total	≤ 500 mg/L	48,84	mg CaCO3/L
Ferro Total	≤ 0,3 mg/L	<0,01	mg Fe/L
Fluoreto total	≤ 1,5 mg/L	0,77	mg F- /L
Gosto	-	Ausente	-
Manganês Total	≤ 0,1 mg/L	0,013	mg Mn/L
Nitrito (como N)	≤ 1 mg/L	<0,02	mg/L NO2-N
pH	entre 6,0 e 9,5 pH a 25ºC	7,13	pH a 25ºC
Turbidez	≤ 5 NTU	1,100	NTU

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Alumínio Total	0,10	0,06	SMEWW 22º edition Method 3500 B	29/11/2016
Cloretos	10,50	-	SMEWW - 22º nd. 2012, Method 4500 Cl B	28/11/2016
Cloro Residual Livre	0,010	0,041	EPA 330.5, APHA 4500 - Cl2 G	25/11/2016
Condutividade	0,01	3,7	SMEWW 22º edition Method 2510 B	25/11/2016
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	25/11/2016
Contagem de Coliformes Totais	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	25/11/2016

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_695.2016_AP_1_1

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Cor Aparente	0,20	0,04	SMEWW 22º edition Method 2120 C	25/11/2016
Dureza Total	1,85	-	SMEWW 22º edition Method - 2340-C	29/11/2016
Ferro Total	0,01	0,04	SMEWW 22º edition Method 3111 B	25/11/2016
Fluoreto total	0,10	0,03	EPA 340.3, APHA 4500-F- E	28/11/2016
Gosto	-	-	MAPA PORT. Nº 01, de 07/10/81	29/11/2016
Manganês Total	0,010	0,058	DIN 38406-2	28/11/2016
Nitrito (como N)	0,02	0,02	EPA 354.1, APHA 4500 -NO2 -B, DIN EN 26777	25/11/2016
pH	1,00	0,03	SMEWW 22º edition Method 4500-H	25/11/2016
Turbidez	0,158	1,00	SMEWW 22º edition Method 2130 B	18/11/2016

Nota 01: As amostragens realizadas pela AQUAVITA seguem o Plano de Amostragem (DQ 5.7.01).
Nota 02: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.
Nota 03: LQ - Limite que Quantificação.
Nota 04: Este relatório só pode ser reproduzido por completo, a reprodução de partes requer a aprovação por escrita da AquaVita.
Nota 05: Verifique a autenticidade deste relatório no site http:///www.laboratorioaquavita.com.br

O(s) parâmetro(s) analisados(s) da referida amostra está(ão) de acordo com a legislação vigente.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

http://www.laboratorioaquavita.com.br

Código: 695.2016 - Chave de autenticação: QB4-AJWS-5D4

Ana Paula Gonçalves Bohm
CRQ 13101074

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

CIEnP
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_758.2016_AP_1_1

São José, 22 de dezembro de 2016

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Cienp Centro de Inovação e Ensaios Pré Clínicos
Endereço: Av. Luiz Bouteix Piazza, 1302
Cidade: Florianópolis , Santa Catarina
CEP: 88.056-000
Fone: (48) 3261-2856

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 758.2016_AP_1_1
Procedência: Água Potável
Ponto Coleta: Água Potável - Água para os animais do biotério
Temperatura Amostra no receb.: 8,0 ºC
Data Recebimento: 15/12/2016 16:00
Responsável pela Coleta: Cliente
Data/Hora Coleta: 13/12/2016

1ª Legislação: Portaria MS 2914 de 12/12/2011 (Federal)

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
Alumínio Total	≤ 0,2 mg/L	<0,10	mg Al/L
Cloretos	≤ 250 mg/L	18,04	mg Cl-/L
Cloro Residual Livre	entre 0,2 e 5,0 mg/L	0,207	mg/L
Condutividade	-	150,00	µS/cm
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Contagem de Coliformes Totais	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Cor Aparente	≤ 15 Pt/Co	3,20	Pt/Co
Dureza Total	≤ 500 mg/L	42,90	mg CaCO3/L
Ferro Total	≤ 0,3 mg/L	0,02	mg Fe/L
Fluoreto total	≤ 1,5 mg/L	0,83	mg F- /L
Gosto	-	Ausente	-
Manganês Total	≤ 0,1 mg/L	0,030	mg Mn/L
Nitrito (como N)	≤ 1 mg/L	<0,02	mg/L NO2-N
pH	entre 6,0 e 9,5 pH a 25ºC	6,86	pH a 25ºC
Turbidez	≤ 5 NTU	3,740	NTU

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Alumínio Total	0,10	0,06	SMEWW 22º edition Method 3500 B	19/12/2016
Cloretos	10,50	-	SMEWW - 22º nd. 2012, Method 4500 Cl B	20/12/2016
Cloro Residual Livre	0,010	0,041	EPA 330.5, APHA 4500 - Cl2 G	15/12/2016
Condutividade	0,01	3,7	SMEWW 22º edition Method 2510 B	16/12/2016
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	19/12/2016
Contagem de Coliformes Totais	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	19/12/2016
Cor Aparente	0,20	0,04	SMEWW 22º edition Method 2120 C	16/12/2016

CIEnP
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_758.2016_AP_1_1

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Dureza Total	1,85	-	SMEWW 22º edition Method - 2340 C	20/12/2016
Ferro Total	0,01	0,04	SMEWW 22º edition Method 3111 B	19/12/2016
Fluoreto total	0,10	0,03	EPA 340.3, APHA 4500-F- E	16/12/2016
Gosto	-	-	MAPA PORT. Nº 01, de 07/10/81	20/12/2016
Manganês Total	0,010	0,058	DIN 38406-2	16/12/2016
Nitrito (como N)	0,02	0,02	EPA 354.1, APHA 4500 - NO2 -B, DIN EN 26777	15/12/2016
pH	1,00	0,03	SMEWW 22º edition Method 4500-H	16/12/2016
Turbidez	0,158	1,00	SMEWW 22º edition Method 2130 B	16/12/2016

Nota 01: As amostragens realizadas pela AQUAVITA seguem o Plano de Amostragem (DQ 5.7.01).
Nota 02: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.
Nota 03: LQ - Limite que Quantificação.
Nota 04: Este relatório só pode ser reproduzido por completo, a reprodução de partes requer a aprovação por escrita da AquaVita.
Nota 05: Verifique a autenticidade deste relatório no site http:///www.laboratorioaquavita.com.br

O(s) parâmetro(s) analisados(s) da referida amostra está(ão) de acordo com a legislação vigente.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

http://www.laboratorioaquavita.com.br

Código: 758.2016 - Chave de autenticação: 29I-P24B-I46

Ana Paula Gonçalves Bohm
CRQ 13101074

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

CIEnP
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_71.2017_AP_1_1

São José, 03 de fevereiro de 2017

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Cienp Centro de Inovação e Ensaios Pré Clínicos
Endereço: Av. Luiz Bouteix Piazza, 1302
Cidade: Florianópolis , Santa Catarina
CEP: 88.056-000
Fone: (48) 3261-2856

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 71.2017_AP_1_1
Procedência: Água Potável
Ponto Coleta: Água Potável - Água para os animais do biotério
Temperatura Amostra no receb.: 8,0 ºC
Data Recebimento: 24/01/2017 14:30
Responsável pela Coleta: Cliente
Data/Hora Coleta: 24/01/2017

Observações: Fab: 20/01/17 Val: 03/02/17
1ª Legislação: Portaria MS 2914 de 12/12/2011 (Federal)

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
1,1-Dicloroeteno *	≤ 30 µg/L	<1,00	µg/L
1,2-Diclorobenzeno *	≤ 0,01 mg/L	<1,00	µg/L
1,2-Dicloroetano *	≤ 10 µg/L	<1,00	µg/L
1,2-Dicloroeteno (cis + trans) *	≤ 50 µg/L	<1,00	µg/L
1,4-Diclorobenzeno *	≤ 0,03 mg/L	<0,5	µg/L
2,4,6-Triclorofenol *	≤ 0,2 mg/L	<0,05	µg/L
2,4-D + 2,4,5-T *	≤ 30 µg/L	<0,05	µg/L
Ácidos Haloacéticos Total *	≤ 0,08 mg/L	<0,08	mg/L
Acrilamida *	≤ 0,5 µg/L	<0,15	µg/L
Alaclor *	≤ 20 µg/L	<0,05	µg/L
Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfóxido *	≤ 10 µg/L	<0,250	µg/L
Aldrin + Dieldrin *	≤ 0,03 µg/L	<0,03	µg/L
Alumínio Total	≤ 0,2 mg/L	<0,10	mg Al/L
Amônia	≤ 1,5 mg/L	<0,06	mg NH3/L
Antimônio *	≤ 0,005 mg/L	<0,005	mg Sb/L
Arsênio total *	≤ 0,01 mg/L	<0,005	mg As/L
Atrazina *	≤ 2 µg/L	<0,05	µg/L
Bário total *	≤ 0,7 mg/L	<0,01	mg Ba/L
Benzeno *	≤ 5 µg/L	<1,00	µg/L
Benzo(a)pireno *	≤ 0,7 µg/L	<0,01	µg/L
Bromato *	≤ 0,01 mg/L	<0,01	mg/L
Cádmio total	≤ 0,005 mg/L	<0,001	mg Cd/L
Carbendazim + benomil *	≤ 120 µg/L	<1,00	µg/L
Carbofurano *	≤ 7 µg/L	<0,05	µg/L
Chumbo total *	≤ 0,01 mg/L	<0,005	mg Pb/L

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_71.2017_AP_1_1

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Sulfato total	25,00	-	SMEWW 22º edition Method 4500A	01/02/2017
Sulfeto de Hidrogênio	0,10	0,07	EPA 376.2, APHA 4500-S2 D	01/02/2017
Surfactantes Aniônicos	0,20	-	EPA 425.1, APHA 5540 C	31/01/2017
Tebuconazol	1,0	-	EPA - Method 8270 D	26/01/2017
Terbufós	0,05	-	EPA - Method 8270 D	26/01/2017
Tetracloreto de carbono	1,0	-	EPA – Method 8015 C	26/01/2017
Tetracloroeteno	1,0	-	EPA - Method 8260B	26/01/2017
THM - Trihalometanos Totais	0,1	-	SMEWW 22º edition Method 6232 B	26/01/2017
Tolueno	1,00	-	EPA – Method 8015 C	26/01/2017
Triclorobenzenos	1,0	-	EPA ? Method 5021 A	26/01/2017
Tricloroeteno	1,0	-	EPA - Method 5021 A	26/01/2017
Trifluralina	0,05	-	EPA - Method 8081 B	26/01/2017
Turbidez	0,158	1,00	SMEWW 22º edition Method 2130 B	25/01/2017
Urânio Total	0,01	-	EPA - Method 5021 A	26/01/2017
Xileno	1,0	-	EPA – Method 8015 C	26/01/2017
Zinco	0,05	-	SMEWW 22ª Ed. Method 3030 E	27/01/2017

Nota 01: As amostragens realizadas pela AQUAVITA seguem o Plano de Amostragem (DQ 5.7.01).
Nota 02: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.
Nota 03: LQ - Limite que Quantificação.
Nota 04: Este relatório só pode ser reproduzido por completo, a reprodução de partes requer a aprovação por escrita da AquaVita.
Nota 05: Verifique a autenticidade deste relatório no site http:///www.laboratorioaquavita.com.br

O(s) parâmetro(s) analisados(s) da referida amostra está(ão) de acordo com a legislação vigente.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

http://www.laboratorioaquavita.com.br

Código: 71.2017 - Chave de autenticação: FQV-3M4R-CI0

Ana Paula Gonçalves Bohm
CRQ 13101074

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

CIEnP
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_179.2017_AP_1_1

São José, 10 de março de 2017

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Cienp Centro de Inovação e Ensaios Pré Clínicos
Endereço: Av. Luiz Bouteix Piazza, 1302
Cidade: Florianópolis , Santa Catarina
CEP: 88.056-000
Fone: (48) 3261-2856

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 179.2017_AP_1_1
Procedência: Água Potável
Ponto Coleta: Água Potável - Água para os animais do biotério
Temperatura Amostra no receb.: 7,8 ºC
Data Recebimento: 02/03/2017 12:05
Responsável pela Coleta: Cliente
Data/Hora Coleta: 21/02/2017

Observações: Validade: 08/03/2017
1ª Legislação: Portaria MS 2914 de 12/12/2011 (Federal)

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
Alumínio Total	≤ 0,2 mg/L	<0,01	mg Al/L
Cloretos	≤ 250 mg/L	21,44	mg Cl-/L
Cloro Residual Livre	entre 0,2 e 5,0 mg/L	0,030	mg/L
Condutividade	-	166,80	µS/cm
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Contagem de Coliformes Totais	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Cor Aparente	≤ 15 Pt/Co	4,80	Pt/Co
Dureza Total	≤ 500 mg/L	36,63	mg CaCO3/L
Ferro Total	≤ 0,3 mg/L	0,03	mg Fe/L
Fluoreto total	≤ 1,5 mg/L	1,35	mg F- /L
Gosto	-	Ausente	-
Manganês Total	≤ 0,1 mg/L	0,050	mg Mn/L
Nitrito (como N)	≤ 1 mg/L	<0,02	mg/L NO2-N
pH	entre 6,0 e 9,5 pH a 25ºC	6,71	pH a 25ºC
Turbidez	≤ 5 NTU	0,72	NTU

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Alumínio Total	0,01	0,06	SMEWW 22º edition Method 3500 B	06/03/2017
Cloretos	10,50	-	SMEWW - 22º nd. 2012, Method 4500 Cl B	08/03/2017
Cloro Residual Livre	0,010	0,041	EPA 330.5, APHA 4500 - Cl2 G	02/03/2017
Condutividade	0,01	3,7	SMEWW 22º edition Method 2510 B	02/03/2017
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	02/03/2017
Contagem de Coliformes Totais	Ausente	-	SMEWW 22º edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	02/03/2017

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

AquaVita
Laboratório de Análises

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_179.2017_AP_1_1

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Cor Aparente	0,20	0,04	SMEWW 22º edition Method 2120 C	03/03/2017
Dureza Total	1,85	-	SMEWW 22º edition Method - 2340-C	08/03/2017
Ferro Total	0,01	0,04	SMEWW 22º edition Method 3111 B	07/03/2017
Fluoreto total	0,10	0,03	EPA 340.3, APHA 4500-F- E	08/03/2017
Gosto	-	-	MAPA PORT. Nº 04, de 07/10/81	07/03/2017
Manganês Total	0,010	0,058	DIN 38406-2	03/03/2017
Nitrito (como N)	0,02	0,02	EPA 354.1, APHA 4500 - NO2 -B, DIN EN 26777	02/03/2017
pH	1,00	0,03	SMEWW 22º edition Method 4500-H	02/03/2017
Turbidez	0,158	1,00	SMEWW 22º edition Method 2130 B	02/03/2017

Nota 01: As amostragens realizadas pela AQUAVITA seguem o Plano de Amostragem (DQ 5.7.01).
Nota 02: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.
Nota 03: LQ - Limite que Quantificação.
Nota 04: Este relatório só pode ser reproduzido por completo, a reprodução de partes requer a aprovação por escrita da AquaVita.
Nota 05: Verifique a autenticidade deste relatório no site http:///www.laboratorioaquavita.com.br

O(s) parâmetro(s) analisados(s) da referida amostra está(ão) de acordo com a legislação vigente.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

http://www.laboratorioaquavita.com.br

Código: 179.2017 - Chave de autenticação: YG9-R6TV-XQD

Ana Paula Gonçalves Bohm
CRQ 13101074

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA